

ZUR ANWENDUNG DES ENZYMIMMUNOLOGISCHEN
NACHWEISES VON AFLATOXIN M₁ BEI
BESTANDSMILCHUNTERSUCHUNGEN IN BAYERN

URSULA BACHNER

Disbui. München

1989

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. Dr. h.c. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Zur Anwendung des enzymimmunologischen Nachweises
von Aflatoxin M₁ bei Bestandsmilchuntersuchungen
in Bayern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ursula B a c h n e r

aus

Bad Waldsee

München 1989

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr.h.c. G. Terplan

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Gedek

Tag der Promotion: 28. Juli 1989

		Seite
1	Einleitung	1
2	Erklärung	2
3	Erklärung	3
4	Einleitung	4
5	Einleitung	5
6	Einleitung	6
7	Einleitung	7
8	Einleitung	8
9	Einleitung	9
10	Einleitung	10
11	Einleitung	11
12	Einleitung	12
13	Einleitung	13
14	Einleitung	14
15	Einleitung	15
16	Einleitung	16
17	Einleitung	17
18	Einleitung	18
19	Einleitung	19
20	Einleitung	20
21	Einleitung	21
22	Einleitung	22
23	Einleitung	23
24	Einleitung	24
25	Einleitung	25
26	Einleitung	26
27	Einleitung	27
28	Einleitung	28
29	Einleitung	29
30	Einleitung	30
31	Einleitung	31
32	Einleitung	32
33	Einleitung	33
34	Einleitung	34
35	Einleitung	35
36	Einleitung	36
37	Einleitung	37
38	Einleitung	38
39	Einleitung	39
40	Einleitung	40
41	Einleitung	41
42	Einleitung	42
43	Einleitung	43
44	Einleitung	44
45	Einleitung	45
46	Einleitung	46
47	Einleitung	47
48	Einleitung	48
49	Einleitung	49
50	Einleitung	50
51	Einleitung	51
52	Einleitung	52
53	Einleitung	53
54	Einleitung	54
55	Einleitung	55
56	Einleitung	56
57	Einleitung	57
58	Einleitung	58
59	Einleitung	59
60	Einleitung	60
61	Einleitung	61
62	Einleitung	62
63	Einleitung	63
64	Einleitung	64
65	Einleitung	65
66	Einleitung	66
67	Einleitung	67
68	Einleitung	68
69	Einleitung	69
70	Einleitung	70
71	Einleitung	71
72	Einleitung	72
73	Einleitung	73
74	Einleitung	74
75	Einleitung	75
76	Einleitung	76
77	Einleitung	77
78	Einleitung	78
79	Einleitung	79
80	Einleitung	80
81	Einleitung	81
82	Einleitung	82
83	Einleitung	83
84	Einleitung	84
85	Einleitung	85
86	Einleitung	86
87	Einleitung	87
88	Einleitung	88
89	Einleitung	89
90	Einleitung	90
91	Einleitung	91
92	Einleitung	92
93	Einleitung	93
94	Einleitung	94
95	Einleitung	95
96	Einleitung	96
97	Einleitung	97
98	Einleitung	98
99	Einleitung	99
100	Einleitung	100

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung
2	Literatur
2.1	Allgemeines
2.2	Physikalisch-chemische Eigenschaften der Aflatoxine
2.3	Metabolisierung von Aflatoxinen
2.4	Schadwirkungen der Aflatoxine
2.4.1	Toxizität bei verschiedenen Tierspezies
2.4.2	Karzinogenität und Mutagenität
2.4.3	Pathologische Veränderungen und Pathophysiologie
3	Vorkommen von Aflatoxin M ₁ (AFM ₁) in Milch und Milchprodukten
3.1	Milch
3.2	Milchprodukte
4	Bewertung des Vorkommens von AFM ₁ in Milch und Milchprodukten auch unter Berücksichtigung anderer Rückstände
5	Wirtschaftliche Gesichtspunkte und Bedeutung von Aflatoxinen
6	Eigene Untersuchungen
6.1	Material und Methoden
6.1.1	Versuchsanordnungen
6.1.2	Untersuchungsmaterial (Probenentnahme, -versand und -lagerung)
6.1.3	Untersuchungsmethoden
6.1.3.1	Semiquantitatives (Screening) Verfahren zum Nachweis von AFM ₁ in Milch
6.1.3.1.1	Prinzip des Screening-Verfahrens zum Nachweis von AFM ₁ in Milch
6.1.3.1.2	Durchführung des Screening-Verfahrens
6.1.3.1.2.1	Reagenzien, Lösungen, Materialien und Geräte
6.1.3.1.2.2	Methodik

	Seite
6.1.3.2	Quantitatives Verfahren zum Nachweis von AFM ₁ in Milch 42
6.1.3.2.1	Probenaufbereitung 43
6.1.3.2.2	Enzymimmunologischer Nachweis 43
7	Ergebnisse 45
7.1	Gesamtergebnis aller untersuchten Milchproben 45
7.1.1	Proben aus dem Einzugsgebiet Kempten (Weidegebiet) 50
7.1.2	Proben aus dem Einzugsgebiet München (Mischgebiet) 52
7.1.3	Proben aus dem Einzugsgebiet Regensburg (Mischgebiet) 54
7.1.4	Proben aus dem Einzugsgebiet Schweinfurt (Ackerbaugesbiet) 57
8	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion 60
9	Zusammenfassung/ Summary 67
10	Literaturverzeichnis 69

In den letzten Jahren ist ein wachsendes Problembewußtsein der Bevölkerung gegenüber Lebensmitteln bezüglich Zusammensetzung, Inhaltsstoffen und Rückständen festzustellen. Dies gilt auch für Milch und Milchprodukte als Grundnahrungsmittel und Hauptnahrungsquelle für Säuglinge und Kleinkinder. Bedeutung wird unter anderem der Kontamination der Milch mit Aflatoxin M_1 (AFM_1) beigemessen, einem Metaboliten von Aflatoxin B_1 (AFB_1), der durch Verfüttern von AFB_1 -haltigen Futtermitteln an laktierende Rinder in die Milch gelangt. Die gesundheitliche Gefährdung beim Verzehr AFM_1 -haltiger Milch oder daraus hergestellter Milcherzeugnisse ist in der karzinogenen und mutagenen Wirkung dieses Mykotoxins begründet.

Da es sich beim Auftreten von AFM_1 in Milch stets um eine durch "carry over" bedingte Kontamination handelt, sind Gegenmaßnahmen im Primärkreis Futtermittel-Milchtier einzuleiten. Der Gesetzgeber versucht dem Rechnung zu tragen, indem er für Futtermittel eine Höchstmengenregelung für Aflatoxine festgelegt hat. Um einen noch weitergehenden Verbraucherschutz zu gewährleisten, sollen in der vorgesehenen Änderung der Aflatoxin-Verordnung, in der bisher nur Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs aufgeführt sind, auch Höchstmengen für Milch festgelegt werden.

Die vorliegende Arbeit sollte einen Überblick über das Vorkommen von Aflatoxin M_1 in Milch in Bayern liefern. Um daneben auch eventuelle jahreszeitliche Schwankungen zu erfassen, wurde über ein Jahr (1987/88) hinweg Bestandsmilch bei Abholung durch die Molkerei entnommen und enzymimmunologisch auf AFM_1 untersucht. Die Proben stammten aus vier Gebieten Bayerns mit unterschiedlicher Agrarstruktur, die gleichzeitig jeweils Einzugsgebiet eines Milchprüfing-Zentrallaboratoriums waren. Pro Gebiet wurden 50 Betriebe zufällig ausgewählt. Sämtliche Proben wurden zunächst mit einem semiquantitativen Suchtest geprüft, der zuvor am Lehrstuhl erarbeitet worden war (HEUSEL, 1987). Die so vorselektierten Proben wurden mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen ELISA quantitativ nachuntersucht.

2

Literatur

Verschiedene Teilaspekte der AFB₁-Thematik, insbesondere Bildung und Vorkommen sowie Nachweisverfahren, wurden bereits in einer am Institut angefertigten Dissertation (HEUSEL, 1987) behandelt. Deshalb beschäftigt sich die vorliegende Literaturübersicht hauptsächlich mit den pathogenen Mechanismen und Auswirkungen von AFB₁ und AFM₁ auf den tierischen Organismus sowie der rückstands-hygienischen Bewertung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchprodukten.

2.1

Allgemeines

Aflatoxine sind toxische und karzinogene sekundäre Metaboliten einiger Stämme von *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* (APPLEBAUM et al., 1982a). Das Wachstum dieser Schimmelpilze und die Bildung von Toxinen kann erfolgen, wenn während der Entwicklung und Ernte der Pflanzen oder Lagerung der Futtermittel über längere Zeit relativ hohe Temperaturen (>25°C) sowie hohe Luftfeuchtigkeit (>90%) herrschen. Deshalb sind zwar Kraftfuttermittel mit Komponenten tropischer und subtropischer Produkte besonders häufig mit Aflatoxinen kontaminiert, doch bei feuchtwarmen Witterungs- und Lagerungsbedingungen können auch wirtschaftseigene Futtermittel wie Heu, Getreide und vor allem verschimmelte Silage betroffen sein. (KIERMEIER et al., 1975). Wenn Tiere mit Aflatoxinen kontaminierte Futtermittel aufnehmen, können sie zum einen in ihrer Gesundheit beeinträchtigt werden, zum anderen muß mit dem Übergang giftiger Stoffwechselprodukte in Lebensmittel tierischen Ursprungs gerechnet werden. So gehen bis zu 3,9% der ursprünglich aufgenommenen AFB₁-Menge in hydroxylierter Form als AFM₁ in die Milch über, mit der es über einen Zeitraum von 2-9 Tagen ausgeschieden wird (SIEBER und BLANC, 1978). Bei der Herstellung von Milchprodukten nimmt der Aflatoxingehalt kaum ab, so daß auch Trockenmilch, Joghurt und Käse aflatoxinhaltig sind (KIERMEIER et al., 1975).

Da Milch vor allem in der Säuglings- und Kleinkinderernährung und als diätetisches Lebensmittel eine wichtige Stellung

einnimmt, muß eine mögliche Gesundheitsgefährdung des Menschen über dieses Grundnahrungsmittel ausgeschlossen werden. Aufgrund der karzinogenen Wirkung der Aflatoxine und der exponierten Stellung obengenannter Risikogruppen wird deshalb im Rahmen des Verbraucherschutzes die Forderung nach weitestgehend aflatoxin-freien Lebensmitteln gestellt.

Höchstmengen für AFB₁ in bestimmten Futtermitteln sind im Futtermittelrecht § 23, Abs.1 der Futtermittelverordnung vom 8. April 1981 (BGBl I S. 352), zuletzt geändert durch die vierte Verordnung vom 23. Januar 1985 (BGBl I S. 170), in der Anlage 5 festgelegt. Die Aflatoxin-Verordnung (Verordnung über Höchstmengen an Aflatoxinen in Lebensmitteln) vom 30.11.1976 (BGBl I S. 3313) enthält lediglich Höchstmengenfestsetzungen für Getreide und pflanzliche Lebensmittel, und zwar für die Aflatoxine B₁, B₂, G₁ und G₂. Lebensmittel tierischen Ursprungs sind in dieser Verordnung bisher nicht berücksichtigt.

2.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Aflatoxine (nach BUSBY und WOGAN, 1984)

Aflatoxine sind substituierte Cumarine mit einem gebundenen Bifuran. Sie können in vier Hauptgruppen aufgeteilt werden, und zwar aufgrund ihrer blauen Fluoreszenz unter UV-Licht in AFB₁ und AFB₂, entsprechend ihrer grünen Fluoreszenz unter UV-Licht in AFG₁ und AFG₂ (Eine Übersicht über die Strukturformeln dieser Toxine gibt Abb. 1). Die B-Toxine sind durch ihren an den Lactonring der Cumarinstruktur gebundenen Cyclopentanring charakterisiert, wohingegen die G-Toxine stattdessen einen zusätzlichen Lactonring aufweisen. AFB₁ und AFG₁ besitzen eine ungesättigte Bindung in der 8,9-Position des terminalen Furanringes. Die biologisch inaktiveren AFB₂ und AFG₂ Moleküle tragen an dieser Stelle eine gesättigte Bindung.

Aflatoxine sind löslich in Methanol, Chloroform und anderen organischen Lösungsmitteln, jedoch nur geringgradig in Wasser. Die Extinktionskoeffizienten in Methanol oder Ethanol variieren von 17.100 für AFG₂ bis zu 24.000 für AFB₂. Die Toxine absorbieren aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen UV-Licht (362 nm)

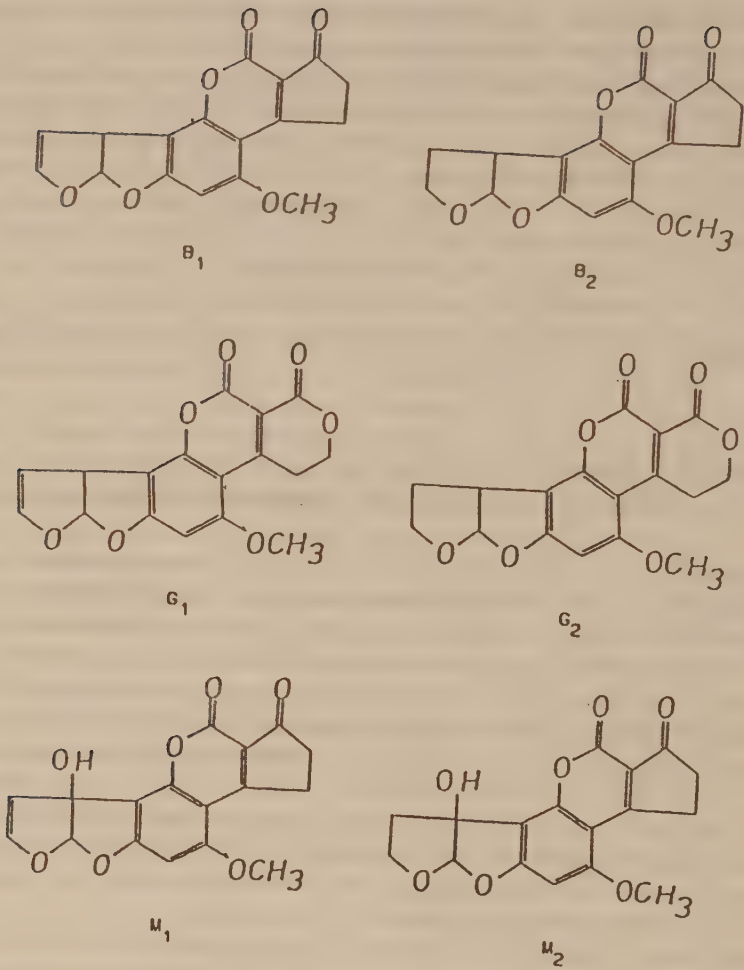


Abb. 1: Strukturformeln einiger Aflatoxine

und können die aufgenommene Energie als Fluoreszenz abstrahlen. Das Emissionsmaximum liegt für AFB₁ und AFB₂ bei 425 nm, für AFG₁ und AFG₂ bei 450 nm. Obwohl die Aflatoxine in Futter- und Lebensmitteln sehr stabil sind, werden sie bei extremen pH-Werten (<3 oder >10) sowie durch oxidierende Agentien oder UV-Exposition bei Anwesenheit von Sauerstoff schnell inaktiviert.

Durch Hydroxylierung von AFB₁ und AFB₂ entstehen die primären Metaboliten AFM₁ bzw. AFM₂ (Abb. 1), die im Verhältnis von ca. 3:1 in der Milch auftreten. Eine Übersicht über die wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften von AFM₁ und AFM₂ gibt Tab. 1.

Tab. 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften von AFM₁ und AFM₂
(nach HOLZAPFEL und STEYN, 1966; ergänzt nach
v.MILCZEWSKI et al., 1981)

Eigenschaften	AFM ₁	AFM ₂
Molekularformel:	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
Molekulargewicht:	328	330
Schmelzpunkt:	299°C (Abbau)	293°C (Abbau)
Löslichkeit:		
löslich in:	Aceton, Benzol MeOH, CHCl ₃ , CH ₃ CN CH ₂ Cl ₂	keine Angaben
unlöslich in:	H ₂ O, Hexan u.a.	
UV-Absorption (Ethanol)	226 (23 100)	221 (20 000)
Extinktionskoeffizient	265 (11 600)	264 (10 900)
maxima bei nm (ε)	357 (19 000)	357 (21 000)
Fluoreszenz-Exzitation:	365 nm	keine
maxima:Emission :	425 nm	Angaben

2.3 Metabolisierung von Aflatoxinen

OBIOHA (1986) führte Versuche zur Verteilung von oral verabreichtem, mit C^{14} radioaktiv markiertem Aflatoxin B_1 bei Hühnern durch. Nach 12 bzw. 24 Stunden konnte AFB_1 bzw. Radioaktivität in Brustmuskulatur, Muskelmagen, Mageninhalt, Darmtrakt, Leber und zu einem geringen Teil auch in Herz, Lunge und Niere nachgewiesen werden. Der Hauptanteil des AFB_1 wurde im Intestinaltrakt, nach Passage des Muskelmagens wiedergefunden. ENGEL und HAGEMEISTER (1978) untersuchten den Einfluß der Verdauung auf AFB_1 zwischen oraler Aufnahme und Übergang in den resorptiven Intestinaltrakt bei Wiederkäuern. Den Autoren zufolge werden 90-95% des verabreichten AFB_1 in den Vormägen abgebaut und mehr als 95% des den Darm erreichenden AFB_1 resorbiert bzw. abgebaut. Ein in-vitro-Versuch mit Pansensaft ergab eine Verminderung des AFB_1 im Pansen um lediglich 40%.

Nach enteraler Resorption aflatoxinhaltiger Futtermittel erfolgt der Ab- und Umbau des Toxins in der Leber.

Grundsätzlich sind folgende metabolische Transformationen der Aflatoxine durch Leberenzyme möglich (nach PATTERSON, 1973).

(Abb. 2)

1. Hydroxylierung
2. O-Demethylierung zu einem Phenolderivat
3. Hemiacetalbildung.
4. Reduktion am Cyclopentanonring zu einem sekundären Alkohol (B-Serie)
5. Hydrolytische Spaltung und Decarboxylierung des δ -Lakton-Rings der G-Aflatoxine
6. Epoxid-Bildung

Die daraus resultierenden bekannten Metaboliten von AFB_1 sind (Die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die vorangegangene Aufstellung): AFM_1 (1); AFP_1 (2); $AFB_{2\alpha}$ oder Aflatoxin B_1 -Hemiacetal (3); Aflatoxicol oder AFF_1 (4); AFB_1 -8,9-Epoxid (6).

Bekannte Metaboliten von AFB_2 : AFM_2 (1); Dihydro-Aflatoxicol oder AFF_2 (4).

Bekannte Metaboliten von G_1 : $AFGM_1$ (1); $AFG_{2\alpha}$ (3); Aflatoxicol B_3 oder Parasiticol (5).

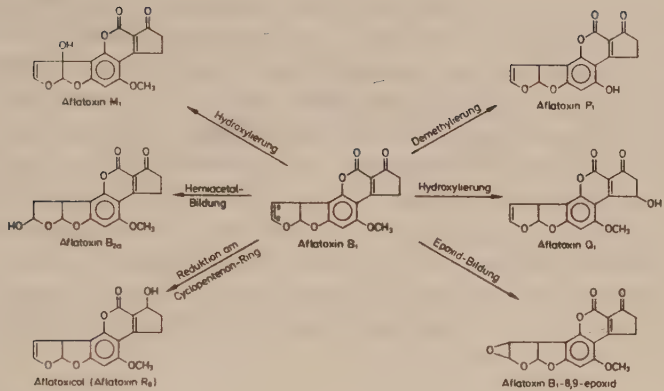


Abb. 2: Mögliche metabolische Transformationen des AFB₁ durch Leberenzyme sowie die entstehenden Metabolite (nach CAMPBELL und HAYES, 1976)

Einerseits kann der Sekundärmetabolismus als Entgiftungsprozeß betrachtet werden, wie beispielsweise die Hydroxylierung von AFB₁ zu AFM₁ (HEESCHEN et al., 1981) oder in geringerem Maß die Demethylierung zu AFP₁. Desweiteren können sulfuronidierte, glucuronidierte und an Proteine gebundene Hydroxy-Metabolite (in konjugierter Form) ausgeschieden werden (STOLOFF, 1980). Andererseits erfordern die Aflatoxine jedoch gleichfalls eine metabolische Umsetzung in eine aktive Form, um zu ihrer letztendlich toxischen, karzinogenen oder mutagenen Wirksamkeit zu gelangen (APPLEBAUM et al., 1982a). Als sogenannte aktive Metaboliten von AFB₁ wurden Aflatoxin B_{2a} und Aflatoxin B₁-8,9-Epoxid angesehen. AFB_{2a} entsteht durch Hydratation der Vinyl-Äther-Doppelbindung von AFB₁ (SCHABORT und STEYN, 1969; GURTOO, 1973) und wurde als aktiv wirksame Form von AFB₁ bezeichnet (PATTERSON und ROBERTS, 1970). Entsprechende Versuche ließen vermuten, daß AFB_{2a} die an Mikrosomen gebundene Aflatoxininform darstellt (GURTOO und CAMPBELL, 1974).

NEAL et al. (1981) entdeckten die Bildung des Metaboliten 2,3-Dihydroxy-2,3-Dihydro-AFB₁ (AFB₁-dhd) durch Rattenlebermikrosomen

und schlossen aus verschiedenen Versuchen, daß AFB₁-dhd früher fälschlicherweise als AFB_{2α} beschrieben wurde.

AFB₁-8,9-Epoxid (in früheren Arbeiten oft als 2,3-Epoxid bezeichnet) entsteht in der Leberzelle enzymatisch oder durch chemische Oxidation von AFB₁ (MARTIN und GARNER, 1977). Dieses elektrophile Agens kann sich unmittelbar an Nukleinsäuren und in geringerem Maß, an Proteine binden. AFB₁-8,9-Epoxid kann deshalb als Vorläufer der mit Nukleinsäuren gebildeten Makromoleküladdukte angesehen werden (WOGAN, 1977). Allerdings wird der größte Teil des gebildeten Epoxids sofort durch enzymatische Konjugation mit Glutathion inaktiviert und über die Galle ausgeschieden (DEGEN und NEUMANN, 1978).

2.4 Schadwirkungen der Aflatoxine

Im folgenden werden die Aflatoxine unter toxischen, karzinogenen und mutagenen Aspekten betrachtet. Aufgrund der Schwierigkeit, AFM₁ in genügender Menge zu erhalten, steht vergleichsweise wenig Literatur über die Auswirkungen von AFM₁ auf den tierischen Organismus zur Verfügung. Deshalb wird hauptsächlich auf das am intensivsten untersuchte AFB₁ eingegangen.

2.4.1 Toxizität bei verschiedenen Tierspezies

Aufgrund der verschiedenartigen Reaktionsmöglichkeiten auf molekularer Ebene können Aflatoxine toxisch, karzinogen oder mutagen sein (CIEGLER, 1975). Die toxische Wirkung der Aflatoxine manifestiert sich je nach Dauer und Dosis der Aflatoxinexposition unterschiedlich. Ebenso variiert die Empfänglichkeit bzw. Empfindlichkeit zwischen und innerhalb verschiedener Spezies (APPLEBAUM et al., 1982a). Tab. 2 zeigt diese unterschiedliche Toxinempfindlichkeit anhand der LD₅₀-Dosen für verschiedene Tierarten.

Tab. 2: LD₅₀ -Werte verschiedener Tierarten
(nach KIERMEIER, 1978)

Tierart	LD ₅₀ in mg/kg KG
Ente	0,350-0,560
Hase	0,3
Katze	0,55
Schwein	0,62
Hund	0,5-1,0
Schaf	1,0
Ratte männl.	7,2
weibl.	17,9
Affe	7,8
Hühnerembryo	0,025 µg/Embryo

Aufgrund schon geringster struktureller Änderungen im chemischen Grundgerüst unterscheiden sich die einzelnen Aflatoxine im Grad ihrer toxischen Eigenschaften (APPLEBAUM et al., 1982a).

AFB₁ weist die höchste Wirksamkeit hinsichtlich der akuten und chronischen Toxizität auf. Wie aus den Tabellen 3 und 4 ersichtlich, ist die akut toxische Wirkung von AFM₁ etwas geringer als die des AFB₁.

Tab. 3: LD₅₀-Werte verschiedener Aflatoxine bei einen Tag alten Entenküken nach oraler Applikation
(nach KIERMEIER, 1978)

Toxin	LD ₅₀ in mg/kg KG
Aflatoxin B ₁	0,36
Aflatoxin B ₂	1,7
Aflatoxin G ₁	0,8
Aflatoxin G ₂	2,5
Aflatoxin M ₁	0,8
Aflatoxin M ₂	3,1

Tab. 4: LD₅₀-Werte verschiedener Aflatoxine
beim Hühnerembryo-Test (nach MOREAU, 1979)

Toxin	LD ₅₀ in µg/Ei
Aflatoxin B ₁	0,025
Aflatoxin B ₂	0,125
Aflatoxin G ₁	1.100
Aflatoxin G ₂	2.700
Aflatoxin M ₁	0,200

Schon 1972 versuchte PATTERSON (1973) den Aflatoxin-Metabolismus mit dessen toxischer Aktion in Verbindung zu bringen. Er verglich die Metabolisierungsrate einer LD₅₀-Dosis bei verschiedenen Tierarten. Aufgrund der Untersuchungsergebnisse konnte eine Einteilung in drei zeitabhängige Gruppen erfolgen: Kaninchen, Entenküken und Meerschweinchen repräsentieren die sogenannte "fast metabolizing group" mit der Fähigkeit, eine Aflatoxin LD₅₀-Dosis innerhalb von 12 Minuten vollständig zu metabolisieren. Zur "intermediate metabolizing group" mit einer Metabolisierungszeit von einigen Stunden gehören Huhn, Maus, Schwein und Schaf; die Ratte, als Vertreter der "slow metabolizing group", benötigt für den vollständigen Metabolismus einer LD₅₀-Dosis mehrere Tage. Kein eindeutiger Zusammenhang ergab sich bei dieser Untersuchung jedoch zwischen Metabolisierungsrate, toxischer Aktion der Aflatoxine und der unterschiedlichen Empfänglichkeit einzelner Tierarten. Augenscheinlich wurde aber, daß Tiere mit schneller Metabolisierung eher zu akuter als zu chronischer Aflatoxikose und Tiere mit langsamem Metabolismus eher zu chronischen als zu akuten Erkrankungen neigen. Sämtliche Spezies, die der Gruppe mit schneller Metabolisierungsrate angehören (Kaninchen, Entenküken, Meerschweinchen), sind fähig, Hemiacetale (von NEAL et al., 1981 als AFB₁-dhd beschrieben) zu bilden. Dies deutet darauf hin, daß der akut toxischen Wirkung die Bildung von Hemiacetalen (bzw. AFB₁-dhd) durch mikrosomale Leberzellenzyme wesentlich zugrunde liegt. Bei langsamer Metabolisierung (Ratte)

wird dagegen die Bildung von Aflatoxinol begünstigt und erst verzögert das Hemiacetal gebildet (PATTERSON, 1973). NEAL et al., (1981) untersuchten auf der Grundlage der Versuche von Patterson (1973) den möglichen Zusammenhang des AFB₁-dhd mit der akut toxischen Wirkung des AFB₁. Steht AFB₁-dhd tatsächlich mit der akut toxischen Wirkung von AFB₁ in Beziehung, erscheint eine Wirkung auf mikrosomaler Basis wahrscheinlich. Den Autoren zufolge variiert die Produktion von AFB₁-dhd durch den hepatischen mikrosomalen Metabolismus in vitro beträchtlich innerhalb der untersuchten verschiedenen Tierspezies. So metabolisierten die Lebermikrosomen von Hühnern zwar absolut mehr AFB₁ als die Lebermikrosomen von Meerschweinchen, jedoch konnten bei beiden Tierarten fast 100% der gebildeten Metaboliten als AFB₁-dhd identifiziert werden. Demgegenüber lagen bei Ratten, der Tierart mit der niedrigsten absoluten Metabolisierungsrate, 46% der gebildeten Metabolite als AFB₁-dhd vor. Bei Mäusen, die zwar insgesamt etwas mehr AFB₁ als die Ratten umsetzten, betrug der Anteil an AFB₁-dhd nur 18%. Die Gesamtrate des, durch die Mikrosomen produzierten, AFB₁-dhd scheint grob die verschiedenen Empfänglichkeiten der Tiere gegenüber den akut toxischen Wirkungen des AFB₁ in-vivo widerzuspiegeln.

2.4.2 Karzinogenität und Mutagenität

AFB₁ ist eines der stärksten natürlich vorkommenden Karzinogene und verursacht in vielen Versuchstieren Leberkrebs. Demgegenüber zeigt AFM₁ eine deutlich geringere karzinogene Wirksamkeit, wie Versuche verschiedener Autoren belegen. So konnten WOGAN und PAGLIALUNGA (1974) hepatozelluläre Karzinome bei allen neun Ratten, denen natürliches AFB₁ verabreicht wurde, feststellen. Dies war jedoch nur bei einem von 29 Tieren, denen die gleiche Menge synthetisches AFM₁ zugeführt wurde, der Fall. Acht dieser 29 Ratten entwickelten hyperplastische Zellen bzw. Zellen im Übergangsstadium, die als neoplastische Vorstufen angesehen werden können. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen CANTON et al., (1975) beim Vergleich der karzinogenen Wirkung von natürlichem AFB₁ und natürlichem AFM₁ an Forellen. Sechs der 48 mit AFB₁

kontaminiertem Futter gefütterten Forellen entwickelten hepatozelluläre Karzinome, elf entwickelten hyperplastische Knötchen. Erst nach Zufuhr einer fast fünffach höheren Dosis AFM_1 konnten hepatozelluläre Karzinome bei einem sowie hyperplastische Knötchen bei drei von 48 Tieren festgestellt werden. Bei Verabreichung der gleichen Dosis AFB_1 bzw. AFM_1 an Ratten wiesen CULLEN et al. (1987) das Auftreten hepatozellulärer Karzinome bei 19 von 20 Tieren der AFB_1 -Gruppe nach. In derselben Zeit hatten sich von den 37 Tieren der AFM_1 -Gruppe bei zwei Tieren hepatozelluläre Karzinome und bei sechs hyperplastische Knötchen entwickelt. Bemerkenswerterweise konnten bei drei Tieren, denen AFM_1 verabreicht wurde, interstitielle Karzinome diagnostiziert werden, davon zwei im Dünndarm und eines im Colon. Die Autoren erklären das Auftreten dieser Karzinome mit der im Vergleich zu AFB_1 höheren Polarität von AFM_1 und bringen die längere Verweildauer von AFM_1 im Darmtrakt mit der Entwicklung dieser Karzinome in Zusammenhang.

Es kann als sicher angesehen werden, daß die Karzinogenität von AFB_1 strikt vom AFB_1 -Metabolismus abhängig ist (STARK, 1986). Änderungen im Metabolismus führen zu Änderungen in der AFB_1 -Karzinogenität: Nahrung (Vitamine, hoher Fettanteil), hormoneller Status, Geschlecht, Art- und Rassenunterschiede sowie Medikamente (z.B. Phenobarbital) sind hierbei von Bedeutung (BUSBY und WOGAN, 1981). Trotzdem ist jedoch kein offensichtlicher, generalisierbarer Zusammenhang zwischen dem in-vitro-Metabolismus von Leberzellmikrosomen verschiedener Tierarten und der Karzinogenität in-vivo erkennbar. Eine positive Korrelation konnte allerdings zwischen dem Verhältnis reduktiver und oxidativer Aktivitäten in in-vitro-Systemen und der Artempfänglichkeit gegenüber dem Karzinogen gefunden werden. Als Grad der reduktiven Aktivität wird das Verhältnis von Aflatoxinol zu AFQ_1 , als Grad der oxidativen Aktivität das Verhältnis von Aflatoxinol zu wasserlöslichen Metaboliten angesehen. Hierbei können Aflatoxinol als intrazelluläres AFB_1 -Reservoir und AFQ_1 als relativ ungiftiges Abbauprodukt angesprochen werden (HSIEH et al., 1977).

Der relevante zelluläre Angriffspunkt bezüglich der karzinogenen Wirkung scheint die Bindung an DNA zu sein (BUSBY und WOGAN, 1981). Aktivierte Aflatoxine binden sich sowohl in-vivo als auch

in-vitro kovalent an makromolekuläre Zellbestandteile wie z.B. DNA, RNA und Protein (STARK, 1986). Der Hauptweg für die Aktivierung geht über Umsetzung durch das "mixed-oxidase System" zum 8,9 Epoxid. Dieses Derivat reagiert mit Nukleinsäuren.

Entsprechend der Hypothese von MONEY-KYRLE (1977) greift das AFB₁-Epoxid die DNA an Steroidbindungsstellen an, da AFB₁ in seinem Aufbau einem Steroid ähnelt. Nach erfolgter Bindung reagiert das Toxin mit den Guanin-Bausteinen an den Steroidbindungsstellen. Während der Zellteilung resultiert daraus ein Stückverlust unter anderem solcher Gene, die die Bindung von Ribosomen an das endoplasmatische Retikulum (ER) steuern. Nach Ablösung der Ribosomen vom ER besteht eine dauerhafte genetische Änderung. Schließen die Ribosomen lysosomale Enzymbildner mit ein, werden die Enzyme unmittelbar ins Cytoplasma ausgeschieden, anstatt über das ER und den Golgi-Apparat in Lysosomen eingeschlossen zu werden. Mittels dieser freien hydrolytischen Enzyme können nun die für Krebszellen charakteristischen Veränderungen, wie Verlust der Wachstumshemmung, verminderte cAMP Konzentration, veränderte Membranpermeabilität und Veränderung in den Chromosomen durch Einfluß lysosomaler DNAsen hervorgerufen werden.

Die in-vivo AFB₁-DNA-Bindung repräsentiert die Artspezifität und den Organotropismus der AFB₁-Karzinogenität: so wird z.B. mehr AFB₁ durch die Leber-DNA von Ratten (sehr empfindlich) als durch die Leber-DNA von Maus oder Hamster (resistent) gebunden. Der AFB₁-Bindungsgrad ist in der Leber als primärem Zielorgan höher als in den Nieren (sekundäres Zielorgan) (WOGAN et al., 1979) und bei männlichen Ratten höher als bei weiblichen (GURTOO und MOTYCKA, 1976). Die mit niedriger AFB₁-DNA-Bindungskapazität verbundene relative Resistenz wird mit der Fähigkeit, Aflatoxin-Metaboliten in Glutathion-Konjugate zu überführen, in Verbindung gebracht (RAJ et al., 1984).

Ca. 90% des nach metabolischer Aktivierung an DNA gebundenen AFB₁ können als Guanin-Derivate angesprochen werden. Das quantitative Hauptderivat ist dabei das 8,9-Dihydro-8-(N⁷-Guanyl)-9-hydroxy-AFB₁ (AFB₁-N⁷-Gua) (ESSIGMANN et al., 1977). AFB₁-Metaboliten, wie z.B. AFM₁ und AFP₁, welche auch die ungesättigte Bindung in der Bifuran-Hälfte des Moleküls enthalten, bilden ebenfalls N-Guanin Addukte (CROY und WOGAN, 1981).

Die meisten Karzinogene sind auch Mutagene (AMES et al., 1973). AFB₁ an sich ist nur schwach mutagen wirksam, wird jedoch durch mikrosomale Metabolisierung oder durch kurzwelliges UV-Licht aktiviert und ruft Mutationen in Bakterien, Algen und Pilzen, in Insekten und verschiedenen Säugetierzellen hervor (STARK, 1986). Eine quantitative Bestimmung der relativen Mutagenität von AFB₁ und seinen Metaboliten konnte durch den AMES-mutant-Salmonella typhimurium-Test (AMES et al., 1973) mit Aktivierung der Komponenten durch Enzyme von Rattenleberzellen durchgeführt werden (Tab. 5).

Tab. 5: Vergleich der mutagenen und karzinogenen Aktivität verschiedener Aflatoxine und Aflatoxin-Metabolite (nach WONG und HSIEH, 1976; WONG et al., 1977)

Substanz	Rel. Mutagenität in % (Ames Test)	Karzinogenität
AFB ₁	100,0	stärkstes Leberkarzinogen bei Ratte und Regenbogenforelle
Aflatoxicol	22,8	besitzt die Hälfte der tumor- erzeugenden Aktivität des AFB ₁ gegenüber Regenbogenforelle
AFG ₁	3,3	bei Ratte u. Regenbogenforelle schwächer tumorerzeugend als AFB ₁
AFM ₁	3,2	besitzt 1/3 der tumorerzeugen- den Aktivität des AFB ₁ gegen- über Regenbogenforelle
AFQ ₁	1,1	erzeugt bei Regenbogenforellen keine Tumoren
AFB ₂	0,2	wirkungslos bei Ratte, schwach wirksam bei Regenbogenforelle
AFP ₁	0,1	
AFG ₂	0,2	erzeugt bei Regenbogenforelle keine Tumore
AFB _{2α}	0,0	
AFG _{2α}	0,0	

Die Fähigkeit von verschiedenen Aflatoxinen und ihren Metaboliten, sich in vitro an DNA zu binden, ist eng mit ihrer mutagenen Wirkung auf Bakterien korreliert (HSIEH et al., 1977). Durch, mittels AFB₁-modifizierter DNA veränderte Pneumokokken riefen Mutationen in Rezipientenzellen hervor (STARK und GIROUX, 1983). Die zytotoxischen und mutagenen Wirkungen von AFB₁ in Salmonellen ssp., E.coli und Pneumokokken beruhen hauptsächlich auf ihrer DNA-Bindungsfähigkeit (ISRAEL-KALINSKY et al., 1982) und sind negativ korreliert mit der Fähigkeit der Zelle, das DNA-Reparatursystem in Gang zu setzen (GARNER und MARTIN, 1979).

2.4.3 Pathologische Veränderungen und Pathophysiologie

Die akute Aflatoxikose ist gekennzeichnet durch Gelbfärbung der Nasenschleimhaut (BUTLER, 1964), multiple Hämorrhagien, Fettakkumulation in der Leber (NEWBERNE und BUTLER, 1969) Läsionen in der Leber mit Wandödemen, Vergrößerung der Gallenblase und Leberzirrhose.

Beim Rind ist die chronische Toxikose an aufgetriebenem Abdomen mit Ascites, struppigem Haarkleid, vergrößerter Leber und genereller Unterentwicklung erkennbar (SCHULTZ, 1980). Zusätzlich können reduzierte Milchleistung, Rektumprolaps, Ödeme in der Bauchhöhle sowie eine trockene, rissige Haut ums Flotzmaul bei gleichzeitiger Normal- oder Untertemperatur auftreten (MERTENS, 1979). Als erste klinische Anzeichen einer chronischen Aflatoxikose werden eine Reduktion der Futteraufnahme, der Gewichtszunahme (LOOSMORE und MARKSON, 1961) sowie des Wachstums (LEWIS et al., 1967) beschrieben.

Postmortale pathologische Veränderungen der Leber als primärem Zielorgan finden sich dosisabhängig als Farbvariationen von leicht gebräunt bis gelb, leichte Vergrößerung oder eventuell Leberzirrhose. Zusätzlich kann eine vergrößerte Gallenblase mit Ödemen um den Gallenblasenhals auftreten (LYNCH et al., 1971). Bei mikroskopischer Untersuchung fallen auf: diffuse Gallengangsproliferation mit begleitender fibroplastischer Proliferation, erweiterte Lymphbahnen und perivaskuläre Ödeme von Arterien und Venen (LYNCH et al., 1971).

BUTLER (1974) untersuchte die Wirkung von AFB_1 auf verschiedene Tierarten und konnte eine Gallengangsproliferation, Fibrose und fettige Infiltration der Leber mit periportal oder zentrolobulärer Nekrose bei Truthühnern, Entenküken, Hühnern, Schweinen, Rindern, Hunden, Katzen, Kaninchen, Meerschweinchen, Affen und Ratten feststellen. Hämorrhagien manifestierten sich bei den einzelnen Tierarten unterschiedlich. So traten subcutane Hämorrhagien bei Hühnern und Entenküken auf und eine hämorrhagische Nekrose der Leber bei Schwein und Affe. Beim Meerschweinchen waren von den Blutungen die Milz, Pankreas, Lunge und die Zona reticularis der Nieren betroffen. Bei Hund und Schwein konnte ein hämorrhagisches Ödem der Gallenblasenmukosa festgestellt werden. Beim Meerschweinchen kam es nach Verabreichung von AFB_1 zur Nekrose der proximalen Nierentubuli und bei Ratten zur Nekrose des tubulären Epitheliums der Nierencortex sowie der Zonae reticularis und fasciculata. KIERMEIER (1977) stellte ein Auftreten von Nierennekrosen an Versuchstieren nach oraler Verabreichung von AFM_1 , nicht jedoch bei Verabreichung von AFB_1 fest. In Versuchen, die APPLEBAUM (1982b) mit zehn fistulierten Holsteinkühen unternahm, konnte er bei Verabreichung reinen AFB_1 's, im Gegensatz zu den Angaben von MERTENS (1979), keinen signifikanten Rückgang der Futteraufnahme oder der Milchproduktion, dagegen eine geringe Erhöhung der somatischen Zellzahl in der Milch feststellen. Interessanterweise ergab sich eine deutlich reduzierte Milchleistung bei Verabreichung eines ungereinigten, aflatoxinhaltigen Schimmelpilzextraktes (*A. parasiticus*), was darauf hindeutet, daß andere Schimmelpilzmetaboliten zum Gesamteffekt beitrugen. ENGEL und HAGEMEISTER (1978) untersuchten die Wirkung von AFB_1 auf die Pansenmikroflora und fanden eine Änderung der Morphologie und Physiologie der Pansenbakterien und infolgedessen reduzierte Produktion flüchtiger Fettsäuren. Da die flüchtigen Fettsäuren von der Kuh zur Energie- und Milchproduktion benötigt werden, könnte diese biologische Aktivität der Aflatoxine zumindest teilweise für den Rückgang der Milchproduktion verantwortlich sein.

Weitere Folgen einer Aflatoxikose äußern sich in Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrien. Durch Lysis der Lysosomenmembran erfolgt die Freisetzung von sauren Hydrolasen. Gleichzeitig wird

die Syntheserate für Fettsäuren und Phospholipide herabgesetzt (SCHULTZ, 1980).

Berichten zufolge hemmt Aflatoxin die Proteinsynthese als eventuelle Folge des Eingriffs in den Stickstoff-Metabolismus (KANEKO und CORNELIUS, 1971). LYNCH et al. (1971/1973) untersuchten die Wirkung von Aflatoxin auf Kälber (Tab. 6). Das Ergebnis der Stickstoffbilanz deutet auf einen extensiven Gewebsabbau hin, wie er auch bei beeinträchtigter Proteinsynthese auftritt. Generell sind Metabolismus und biologische Wirkung der Aflatoxine bei Wiederkäuern und Monogastriern ähnlich.

Tab. 6: Wirkung oral verabreichten Aflatoxins auf Kälber
(KANEKO und CORNELIUS, 1971; LYNCH et al., 1971/1973)

Rückgang :	Anstieg :
Futterraufnahme	alk. Phosphatase im Serum
Gewichtszuwachs	Gesamtbilirubin
Serum Carotin	Urinvolumen
Serum Vit. A	Stickstoff im Urin
Anorg. Phosphor im Serum	Creatinin im Urin
Stickstoffnutzung	Serumglutamat-oxalacetat-
Fäkaler Stickstoffgehalt	transaminase
Leber (Speicher) Glykogen	

Im Gegensatz dazu fanden APPLEBAUM und MARTH (1983) in ihrer Untersuchung der Blutparameter zweier mit AFB₁ gefütterter Kühe relativ unveränderte Werte bei: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, alk. Phosphatase, Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, Bilirubin, Cholesterin, Triglyceride, Gesamteiweiß, Harnstoff, Stickstoff, Creatinin und Harnsäure. Sechs Kühe zeigten bei Verabreichung reinen AFB₁'s einen Anstieg von Trijodthyronin (T₃) um 12%, einen Abfall der hormonbindenden Kapazität von T₃ um 4% und keine Veränderung des Thyroxin (T₄)-, Cortisol-, Insulin- und Glukosegehaltes. Bei einem mit ungereinigtem, AFB₁-haltigen Schimmelpilzextrakt gefütterten Tier

fiel der Wert der Serumglukose um 9% bei gleichzeitiger Reduktion der Milchleistung.

Die in-vitro-Wirkung von Aflatoxinen auf die unspezifische Abwehr untersuchten CHANG und HAMILTON (1979) bei Hühnern. Bei dieser Untersuchung standen die Phagozytose und die bakteriziden Fähigkeiten der den menschlichen neutrophilen Granulozyten analogen heterophilen im Vordergrund. Bei insgesamt verminderter Phagozytoserate waren spontane und chemotaktische Bewegung wie auch die Fähigkeit, phagozytierte Bakterien abzutöten, reduziert. Die Aktivität der zellulären und humoralen Faktoren, die für eine optimale Phagozytose notwendig sind, waren unabhängig voneinander vermindert. Die Beeinträchtigung der Effektivität unspezifischer Abwehrmechanismen und der Immunität während einer Aflatoxikose faßten PIER et al. (1980) zusammen. So reduzierte Aflatoxin die Immunantwort nach aktiver Immunisierung gegen einige Infektionskrankheiten wie z.B. Geflügelcholera und Schweinerotlauf, so daß Tiere, die während der Aflatoxinexposition geimpft wurden, keine adäquate Immunität gegenüber virulenten Organismen entwickelten (PIER und HEDDLESTON, 1970; CYSEWSKI et al., 1978). Eine wichtige Wirkung von Aflatoxin auf die spezifischen Abwehrmechanismen betreffen das zellvermittelte Immunsystem. Aflatoxin verursacht eine Rückbildung des Thymus, eine eingeschränkte lokale Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp, eingeschränkte Aktivität der Lymphokine (Hemmung der Leukozytenwanderung und Stimulierung der Lymphoblastogenese) und eine verminderte Neigung zu Abstoßungsreaktionen gegenüber Transplantaten (PIER et al., 1977). Die Quantität und Qualität humoraler Antikörper sind dagegen erst bei Verabreichung hoher Aflatoxindosen beeinträchtigt. In diesem Fall sind die Immunglobuline IgA und IgG, nicht jedoch IgM, reduziert (GIAMBRONE et al., 1978). Aflatoxin vermindert einige unspezifische humorale und zelluläre Mechanismen der angeborenen Immunität. So konnte in Meerschweinchenserum eine eingeschränkte Aktivität von Komplement (THURSTON et al., 1972) und bei Kaninchen eine verzögerte Interferon-Produktion und eine verminderte Phagozytoserate bei Lungenmakrophagen festgestellt werden (RICHARD und THURSTON, 1975). Aflatoxin-Verabreichung erhöht die Empfindlichkeit von Geflügel gegenüber Candidiose (HAMILTON und HARRIS, 1971), Coccidiose (WYATT et al., 1975) und einigen

Salmonellosen. Die Effektivität angeborener und erworbener Immunität kann schon bei Toxinkonzentrationen eingeschränkt sein, die noch kein klinisches Bild einer Mykotoxikose verursachen. Die zugrundeliegende mykotoxische Ätiologie kann deshalb auch unerkannt sein, weil die Symptome einer Krankheit auf das infektiöse Agens bezogen werden. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß Aflatoxin eine größere Rolle bei Infektionskrankheiten spielen könnte als bisher angenommen.

3 Vorkommen von Aflatoxin M_1 (AFM_1) in Milch und Milchprodukten

Die Kontamination von Milch und Milchprodukten mit Aflatoxinen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen durch direkte Verschimmelung (direkte Kontamination), die praktisch nur bei nicht flüssigen Milchprodukten, allen voran Käse, auftreten kann. Zum anderen über verschimmeltes bzw. aflatoxinhaltiges Futter (indirekte Kontamination) (KIERMEIER, 1981).

Laktierende Kühe, die AFB_1 -kontaminiertes Futter fressen, scheiden den hydroxylierten AFB_1 -Metaboliten AFM_1 über die Milch aus. AFM_1 ist stabil in rohen und bearbeiteten Milchprodukten. Pasterisierung sowie die Verarbeitung von Milch zu Käse, Butter, Joghurt und Milchpulver verringern den AFM_1 -Gehalt nur unbedeutend. AFM_1 scheint Affinität zu der Kaseinfraktion der Milch zu besitzen, so daß eine Konzentrierung des Kaseins bei der Milchverarbeitung (Käse, Kaseinat etc.) auch eine Konzentration des AFM_1 bedingt (APPLEBAUM et al., 1982a).

3.1 Milch

Eine Literaturübersicht über die Ausscheidung von AFM_1 in die Milch geben SIEBER und BLANC (1978). Demnach scheiden laktierende Kühe zwischen 0,35 und 3,96% der aufgenommenen AFB_1 Menge als AFM_1 mit der Milch aus.

Eine mit neueren Arbeiten ergänzte Übersicht über das Vorkommen von AFM_1 in Milch gibt Tab. 7:

Tab. 7: Vorkommen von AFM₁ in Milch

(aus SIEBER und BLANC, 1978; ergänzt nach MAJERUS und WOLLER, 1985; PIVA et al., 1987)

Autor	Anzahl Proben	Nachweisgrenze µg/kg	positiv in %
ALLCROFT u. CARNAGHAN 1963	19	k.A.	neg.
PURCHASE u. VORSTER 1968	21	0,16	23,8
BREWINGTON et al. 1970	k.A.	<1	neg.
KIERMEIER u. MÜCKE 1972	61	0,04	46
LEMIESZEK-CHODOROWSKA 1974	31	0,05	neg.
KIERMEIER et al. 1975	165	0,04	22
PAUL et al. 1977	56	<1	7,1
FRITZ et al. 1977	36	0,1	11
KIERMEIER et al. 1977	419	0,02	18,9
POLZHOFFER 1977	260	0,05	45
PEE et al. 1977	68	k.A.	61,7
MAJERUS u. WOLLER 1985	99	0,05	1
MAJERUS u. WOLLER 1985	124	0,025	3
PIVA et al. 1985	82	k.A.	85,5
PIVA et al. 1987	313	k.A.	13,0
PIVA et al. 1987	276	0,001	25,3

k.A.: keine Angaben

3.2 Milchprodukte

Die Ergebnisse der in der Bundesrepublik Deutschland in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen auf AFM₁ in Milchprodukten sind in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Vorkommen von AFM₁ in Milchprodukten in der Bundesrepublik Deutschland

POLZHOFFER (1977)

Produkt	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ µg/kg	
			%	x _{max}	x _A
Frischkäse	80	34		0,51	0,23
Hartkäse	77	51		0,23	0,43
Camembert	65	75		1,30	0,31
Schmelzkäse	134	40		0,55	0,26
Milchpulver	41	73		2,00	0,50
Joghurt	54	82		0,47	0,20

x_A: arithmetischer Mittelwert der AFM₁-haltigen Proben

RANFFT (1983)

Produkt	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ µg/kg
		Anzahl	%	
Milchpulver	95	46	48,8	0,1-1,0
		1	1,1	2,55

MAJERUS und WOLLER (1985), Untersuchungsjahre 1978-80

Produkt	n	<u>positiv</u>	
		Anzahl	%
Vollmilchpulver	39	15	38,5
Magermilchpulver	63	49	77,8
Kondensmilch	36	23	63,9
Quark	28	10	35,7
Joghurt	18	-	-

Fortsetzung Tab. 8: Vorkommen von AFM₁ in Milchprodukten in der Bundesrepublik Deutschland

MAJERUS und WOLLER (1985), Untersuchungsjahre 1982-84

Produkt	n	<u>positiv</u>	
		Anzahl	%
Milchpulver	78	17	21,8
Kondensmilch	37	2	5,4
Quark	59	4	6,8
Joghurt	23	-	-

KIERMEIER (1985)

Produkt	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ ng/kg
		Anzahl	%	
Milcherzeugnisse (Milchpulver, Kondensmilch)	321	86	26,7	nicht angegeben
Butter	12	3	25,0	< 25
Käse	558	143		< 250*
		92		> 250

* 250 ng/kg = Schweizer Grenzwert für AFM₁ in Käse

PIVA et al. (1987) geben eine Übersicht über die italienischen Untersuchungen auf AFM₁ in Milchprodukten (Tab. 9).

In der 1986 durchgeführten Untersuchung konnte ein Nord-Süd-Gefälle festgestellt werden, denn nur 7,7% der Proben aus Zentral- und Südtalien waren positiv mit maximal 50 ng AFM₁/kg.

Tab. 9: Vorkommen von AFM₁ in Milchprodukten in Italien

RIBERZANI (1983)

Produkt	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ ng/kg
		Anzahl	%	
Milchpulver	233	58	24,9	2-8

PIVA et al., (1987), Untersuchungsjahr 1984

Prod.	Herkunft**	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ ng/kg
			Anzahl	%	
Käse	D	34	9	26,5	5-100
Käse	NL	43	23	53,5	5-250*
Käse	F	82	14		<250
			2		>250

* 250 ng/kg: Schweizer Grenzwert für Käse

** D= Bundesrepublik Deutschland; NL= Niederlande;
F= Frankreich

PIVA et al., (1985)

Prod.	Herkunft	n	<u>positiv</u>		AFM ₁ ng/kg
			Anzahl	%	
Käse	Italien	83	62		<250*
			9		>250

* 250 ng/kg: Schweizer Grenzwert für Käse

**Fortsetzung Tab. 9: Vorkommen von AFM₁ in Milchprodukten
in Italien**

PIVA et al. (1987), Untersuchungsjahr 1986

Prod.	Herkunft	n	positiv		AFM ₁ ng/kg
			Anzahl	%	
Käse	Italien	416	121		<250*
			9		>250

* 250 ng/kg: Schweizer Grenzwert für AFM₁ in Käse

TRUCKSESS und PAGE (1986) untersuchten im Jahr 1985 in den USA 118 Proben verschiedener importierter Käsesorten aus 13 Ländern. In 6,8% der Proben konnte AFM₁ mit Gehalten zwischen 0,1 und 1,0 ng/kg nachgewiesen werden, wobei je zwei positive Proben aus England, Frankreich, Holland und der Schweiz stammten. Während der Lagerung und Reifung des Käses konnte von den Autoren fast nur Wachstum von Penicilliumarten festgestellt werden, so daß eine mögliche von Schimmelpilzen verursachte Aflatoxinproduktion während dieser Zeit nahezu ausgeschlossen werden kann.

**4 Bewertung des Vorkommens von AFM₁ in Milch und
Milchprodukten auch unter Berücksichtigung
anderer Rückstände**

Die Kontamination der Milch und daraus hergestellter Produkte mit AFM₁ erfolgt nahezu ausschließlich über die Aufnahme AFB₁-haltiger Futtermittel durch laktierende Kühe.

Mit der Aufnahme aflatoxinhaltiger Lebensmittel erklären COULTER et al. (1984) auch das Auftreten von AFM₁ und/oder AFM₂ in Humanmilch bei 37 von 99 untersuchten Proben im Sudan. 13 Milchproben enthielten AFM₁, 11 AFM₂ und wiederum 13 Milchproben sowohl AFM₁ als auch AFM₂. AFM₁ konnte ebenfalls in drei von 14 Blutproben nachgewiesen werden. Obwohl keine Korrelation zwischen

AFM₁ in Muttermilch und AFM₁-Gehalt in Urin- bzw. Blutproben der Kinder hergestellt werden konnte, schließt dies eine Schädigung der Kinder durch längerdauernde Aflatoxinexposition über die Muttermilch jedoch nicht aus.

Es steht außer Frage, daß die gesundheitliche Gefährdung durch AFM₁ weitaus geringer einzuschätzen ist als die durch AFB₁. So errechneten PATTERSON et al. (1980) zur Induktion von Leberzellkarzinomen unter Zugrundelegung einer täglichen Aufnahme von 3,5 ng AFM₁ pro kg Körpergewicht, die tägliche Mindestaufnahme von 7,2 Litern Milch mit einem Gehalt von 34 ng AFM₁/l, für einen 70 kg schweren Menschen. Wenn auch für einen erwachsenen Menschen das potentielle Risiko durch Milch relativ gering ist, sollte die Gefährdung von Säuglingen und Kleinkindern, die allein schon durch ihr geringes Körpergewicht eine exponierte Stellung einnehmen und zusätzlich überwiegend mit Milch und Milchprodukten ernährt werden, sehr ernst genommen werden.

Obwohl die in Rohmilch festgestellten Aflatoxingehalte nicht besorgniserregend sind (KIERMEIER et al., 1977), sollte die Kontamination auf unvermeidbare Werte beschränkt sein. In einer von 1981 bis 1985 durchgeführten Studie konnten HEESCHEN et al. (1986) eine wesentliche Verbesserung im Bereich der AFM₁-Gehalte der Milch feststellen (Tab. 10).

Tab. 10: Entwicklung der Rückstände von AFM₁ in Milchproben der BRD seit 1981; x_G/x_A in ng/kg (HEESCHEN et al., 1986)

Zeit- raum	n	Herden- sammelmilch x_G/x_A^*	n	Tankwagen- sammelmilch x_G/x_A	n	past.Trink- u. Werkmilch x_G/x_A
1981	40	33,2/51,7	-	n.u.**	-	n.u.**
1982	103	25,8/29,3	314	21,2/25,3	9	48,8/54,9
1983	30	14,4/24,8	88	19,6/26,8	-	n.u.*
1984	214	7,8/12,9	19	12,8/16,4	168	10,8/16,7
1985	183	4,1/ 7,5	37	4,6/6,5	85	5,7/8,3

*: geometrischer (x_G) und arithmetrischer (x_A) Mittelwert

** : nicht untersucht

Die Autoren führen dies auf den weitgehenden Verzicht der Zuzusammischung von häufig mit Aflatoxinen kontaminierten Rohstoffen wie Erdnuß-, Baumwollsaat- und Kokosprodukten zu Milchviehmischfüttermitteln zurück.

In der BRD sind für manche Rückstände in Lebensmitteln Höchstmengen festgelegt, die eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers ausschließen sollen. Die toxikologische Beurteilung von Rückständen beruht auf der "Duldbaren Konzentration", die sich aus der "Duldbaren Tägliche Aufnahme" (ADI= acceptable daily intake) unter Berücksichtigung von Körpergewicht und aufgenommener Lebensmittelmenge ergibt. (HEESCHEN et al., 1986)

Die Bewertung eines gesundheitsschädlichen Rückstandes wie AFM₁ sollte allerdings nicht isoliert erfolgen, da andere Schadstoffe einen synergistischen Effekt haben können, auch im Hinblick auf eine vermehrte Ausscheidung.

Eine Gruppe an Rückständen, bei der ein entsprechender Effekt in Bezug auf AFM₁ möglich ist, sind die Polychlorierten Biphenyle. So konnten HALVORSON et al. (1985) einen Zusammenhang zwischen Aflatoxin M₁-Ausscheidung und PCB's herstellen. Sie wiesen nach, daß nach Induktion mikrosomaler Enzymsysteme durch PCB ein erhöhter Umbau von AFB₁ zu AFM₁ stattfindet.

5 Wirtschaftliche Gesichtspunkte und Bedeutung von Aflatoxinen

Da es sich beim Auftreten von AFM₁ in Milch praktisch stets um eine Ausscheidung von metabolisiertem AFB₁ aus Futtermitteln handelt, kann eine wirkungsvolle Bekämpfung im wesentlichen über Restriktionen im Futtermittelbereich erreicht werden (HEESCHEN et al., 1981).

In der Bundesrepublik Deutschland sind in der 1977 in Kraft getretenen Aflatoxin-Verordnung Höchstwerte für die Aflatoxine AFB₁, AFB₂, AFG₁ und AFG₂ für bestimmte Lebensmittel festgelegt (für AFB₁: 5 µg/kg Lebensmittel). Zum weiteren Schutz des Verbrauchers vor aflatoxinhaltigen Lebensmitteln tierischen Ursprungs und zum gesundheitlichen Schutz der Tiere selbst sind in

der Futtermittel-Verordnung Höchstwerte für Aflatoxine in Futtermitteln festgelegt (MÜCKE und SCHULTZE, 1981).

In den USA darf der Gehalt an AFB_1 in Baumwollsaat zur Verfütterung an laktierende Kühe $20 \mu\text{g/kg}$ nicht überschreiten, in flüssigen Milchprodukten darf der AFM_1 Gehalt höchstens $0,5 \text{ ng/ml}$ betragen (PRICE et al., 1985). In der Schweiz wurde 1977 von den zuständigen Landwirtschaftsbehörden die Verwendung von Erdnußprodukten mit nachweisbarem Aflatoxingehalt zur Milchviehfütterung verboten, da besonders diese häufig mit Aflatoxinen kontaminiert sind (ZIMMERLI und BLASER, 1979). Gleichzeitig wurden Höchstwerte für AFM_1 in Milch auf 20 ng/l , für AFM_1 in Käse auf 250 ng/kg und in Säuglingsmilchprodukten in trinkfertiger Verdünnung auf 10 ng/l festgelegt (KIERMEIER, 1985).

Für die Aflatoxin-Rückstände in der Milch sind in der Bundesrepublik Deutschland importierte Kraftfuttermittel und Mais maßgebend. Bei ersteren ist der AFM_1 -Gehalt auf bestimmte Komponenten wie Erdnüsse, Baumwollsaat, Kokos- und Palmkernprodukte zurückzuführen (HEESCHEN et al., 1983). Generell stellen die Erdnüsse die wesentlichste Toxinquelle dar, selbst noch in den letzten 10 Jahren wurden in den USA in ca. 15%, in Thailand sogar in ca. 50% der Proben teilweise hohe Mengen an Aflatoxinen festgestellt (SCHULTZ, 1980).

Wirtschaftliche Probleme können sich aus dem Vorkommen von Aflatoxinen in Kraftfutterkomponenten besonders für tropische Exportländer ergeben, da hier aufgrund der klimatischen Bedingungen ein starkes Schimmelpilzwachstum und somit Toxinbildung bevorzugt stattfinden können. Werden diese Exportgüter wegen zu hoher Aflatoxin-Gehalte zurückgewiesen, bedeutet das gerade für Länder, die auf den Export ihrer Agrarprodukte angewiesen sind, hohe wirtschaftliche Einbußen. Andererseits ist es aber auch für die importierenden Länder sehr wichtig, durch Erwerb der billigeren ausländischen Kraftfuttermittel die Kosten der Milchprodukte so niedrig wie möglich zu halten. Die Verwendung aflatoxinhaltiger Futtermittel birgt für die Länder mit ausgeprägter Milchwirtschaft die Gefahr der Verluste durch Zurückweisung aflatoxinhaltiger Milchprodukte.

Auf welchem schmalen Grat der Kompromiß zwischen gesundheitspolitisch bedingten gesetzlichen Maßnahmen und wirtschaftlichen

Interessen sich bewegt, verdeutlicht ein Beispiel aus den USA. Dort wurde 1969 ein Höchstgehalt von 20 ppb AFB₁ in Mais von der Food and Drug Administration (FDA) festgelegt. 1977 wurden in den südöstlichen Staaten der USA jedoch große Mengen Mais geerntet, deren AFB₁-Konzentration 20 ppb weit überschritt. Auf Anfrage dieser Staaten erhöhte daraufhin die FDA den Grenzwert auf 100 ppb für den innerstaatlichen Handel, sofern der Mais nicht für menschlichen Verzehr bestimmt war. Im folgenden Jahr wurde der Höchstwert wieder auf 20 ppb gesenkt, um bei der nächsten Mißernte wieder auf 200 ppb für innerstaatlichen und 100 ppb für zwischenstaatlichen Handel angehoben zu werden. Später wurde im Rahmen einer Baumwollsaatmisernte in Arizona von der FDA Baumwollsaatmehl bis zu einer Konzentration von 300 ppb Aflatoxin erlaubt, so lange es an erwachsene, nicht laktierende Tiere verfüttert wurde (HAMILTON, 1984).

So ist das hauptsächliche Ziel eingeführter Kontrollmaßnahmen nach wie vor die Verhütung einer Kontamination von Futter- und Lebensmitteln durch Aflatoxine während Wachstum der Pflanzen, Ernte, Lagerung und Verarbeitung. Einige "Farm-Management-Praktiken" können Pilzinvasion und Aflatoxin-Produktion schon im Feld verhindern: Verwendung gesunden, pilzfreien Saatgutes, Insekten- und Krankheitsbekämpfung, adäquate Düngung, Vermeidung zu großer Trockenheit, möglichst rechtzeitige Ernte und Verwendung von Erntetechniken, die mechanische Schädigungen minimieren. Das Problem einer Kontamination mit Aflatoxinen nach der Ernte kann im Prinzip durch schnelle Trocknung der geernteten Produkte sowie durch vernünftige Handhabung, Lagermöglichkeiten und Bedingungen kontrolliert werden, wobei die Feuchtigkeit auf einem dem Schimmelpilzwachstum nicht zuträglichen Niveau gehalten wird (BUSBY und WOGAN, 1984). Manche Aflatoxinkontamination scheint jedoch nicht vermeidbar zu sein, wenn klimatische Faktoren mit anderen Faktoren auf breiter regionaler Ebene in ungünstiger Weise zusammentreffen.

6 Eigene Untersuchungen

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Versuchsanordnungen

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von AFM_1 in Bestandsmilch über ein Jahr (1987/88) zu ermitteln. Hierbei sollten Häufigkeit, Konzentration und regionale Schwankungen der AFM_1 -Gehalte sowie eventuelle Einflüsse von Fütterung, Tierhaltung, Standort und Jahreszeit auf diese Toxinquelle beobachtet werden. Zur Untersuchung kamen Milchproben, die im Rahmen der routinemäßigen Güteuntersuchung entnommen worden waren, aus dem Einzugsbereich von vier Regional-Laboratorien des Milchprüfrings Bayern. Die vier Einzugsbereiche wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Agrarstruktur ausgewählt: je eine Region mit überwiegendem Grünlandanteil (Weidegebiet), mit überwiegendem Feldfutteranbau (Ackerbaugebiet) sowie zwei Gebiete, in denen sowohl Grünlandwirtschaft als auch Ackerbau betrieben wird (Mischgebiete) (Abb.3).

Sämtliche Proben wurden zunächst mit einem am Lehrstuhl erarbeiteten semiquantitativen Suchtest (Screening-Verfahren) geprüft (HEUSEL, 1987). Die so vorselektierten positiven Milchproben wurden mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen ELISA quantitativ nachuntersucht. Sowohl das semiquantitative als auch das quantitative Verfahren wurden als heterologer ELISA durchgeführt, d.h. im Enzymkonjugat wurde das heterologe Antigen Aflatoxin B_1 (AFB_1) verwendet.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden außerdem 60 im Screening-Verfahren negative Proben (<10 ng/kg) quantitativ nachuntersucht.



Abb. 3: Geographische Lage der Herkunftsgebiete der Milchproben
(schraffiert)

Angaben zur Landkarte Abb 3:

Gebiet um Kempten: Weidegebiet

Milchanlieferung an Molkereien je ha landwirtschaftlich
genutzter Fläche: 3287 l/Jahr;
Zahl der Milchkühe je 100 ha Fläche: 76;
Prozentualer Anteil der Landwirtschaftsfläche: 59,0 %;
Davon prozentualer Anteil Dauergrünland: 99,8 %.

Gebiet um München: Mischgebiet

Milchanlieferung an Molkereien je ha landwirtschaftlich
genutzter Fläche: 1116 l/Jahr;
Zahl der Milchkühe je 100 ha Fläche: 28;
Prozentualer Anteil der Landwirtschaftsfläche: 38,1 %;
Davon prozentualer Anteil Dauergrünland: 20,3 %.

Gebiet um Regensburg: Mischgebiet

Milchanlieferung an Molkereien je ha landwirtschaftlich
genutzter Fläche: 1394 l/Jahr;
Zahl der Milchkühe je 100 ha Fläche: 37;
Prozentualer Anteil der Landwirtschaftsfläche: 57,6 %;
Davon prozentualer Anteil Dauergrünland: 16,8 %.

Gebiet um Schweinfurt: Ackerbau

Milchanlieferung an Molkereien je ha landwirtschaftlich
genutzter Fläche: 766 l/Jahr;
Zahl der Milchkühe je 100 ha Fläche: 22;
Prozentualer Anteil der Landwirtschaftsfläche: 62,4 %;
Davon prozentualer Anteil Dauergrünland: 7,2 %.

aus: Bayerischer Agrarbericht 1986

6.1.2 Untersuchungsmaterial (Probenentnahme, -versand und -lagerung)

Von Mai 1987 bis April 1988 wurden 6445 Bestandsmilchproben untersucht. Die Proben stammten aus vier Einzugsgebieten des Milchprüfrings Bayern mit unterschiedlicher Agrarstruktur (Kempten, München, Regensburg und Schweinfurt).

Die insgesamt 200 willkürlich ausgewählten Betriebe (jeweils 50 pro Einzugsbereich) konnten zum größten Teil während des ganzen Jahres im Untersuchungsprogramm behalten werden. Ein geringer Teil mußte infolge Betriebsaufgabe und Tourenänderung der Molke-reien durch andere Betriebe ersetzt werden. Da teilweise Lieferungen ausfielen, differiert die Gesamtzahl untersuchter Proben pro Gebiet. Die Identifizierung und Zuordnung der jeweiligen Proben erfolgte anhand der Betriebsnummern.

Die Probenentnahme erfolgte in den Monaten Februar, März, April, Mai, Oktober und November wöchentlich, in den Monaten Juni, Juli, August, September, Dezember und Januar 14tägig. Die Gebietsverteilung der insgesamt 6445 untersuchten Proben ergab sich wie folgt:

Kempten (Weidegebiet):	1465 Proben
München (Mischgebiet):	1533 Proben
Regensburg (Mischgebiet):	1697 Proben
Schweinfurt (Ackerbaugebiet):	1750 Proben

Die Bestandsmilchproben wurden im Rahmen der routinemäßigen Güteprüfung des Milchprüfrings bei Abholung durch die Molkerei entnommen und mit Natriumazid konserviert. Nach erfolgter Untersuchung durch die Untersuchungsstellen der jeweilig zuständigen Zentral-Laboratorien des Milchprüfrings wurden die Proben aus Kempten, Regensburg und Schweinfurt per Kurier an die Münchner Zentrale des Milchprüfrings verschickt. Die Proben aus dem Münchner Raum wurden direkt vom Untersuchungslabor abgeholt. Proben die nicht sofort untersucht werden konnten, wurden bei -20 °C tiefgefroren.

Die Zeit von der Probenentnahme bis zur Untersuchung der konservierten und nicht tiefgefrorenen Proben auf ihren AFM₁-Gehalt dauerte längstens drei Tage. Tiefgefrorenes Untersuchungsmaterial wurde spätestens nach vier Wochen aufgetaut und analysiert.

6.1.3 Untersuchungsmethoden

6.1.3.1 Semiquantitatives (Screening) Verfahren zum Nachweis von AFM₁ in Milch (HEUSEL, 1987)

6.1.3.1.1 Prinzip des Screening-Verfahrens zum Nachweis von AFM₁ in Milch

Grundlage des Screening-Verfahrens ist der zum Nachweis von AFM₁ in Milch und Milchpulver von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebene heterologe kompetitive ELISA in konsekutiver Anordnung.

Hierbei werden freies (gesuchtes) und enzymmarkiertes Toxin nacheinander mit dem an eine Festkörperphase adsorbierten spezifischen Antikörper inkubiert. Die Menge des gebundenen enzymmarkierten Toxins ist umgekehrt proportional der Konzentration des freien Toxins und kann anhand des durch das Enzym bewirkten Substratsatzes gemessen werden. Die Extinktionen der Toxinstandards und Proben werden mittels ELISA-Autoreader bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Zur quantitativen Bestimmung wird aufgrund der ermittelten Werte des Toxinstandards eine Standardkurve erstellt, anhand der wiederum die Toxingehalte der Proben durch Interpolation festgestellt werden können.

Das Prinzip des semiquantitativen Screening-Verfahrens beruht auf der Ermittlung von Extinktionsdifferenzen, die sich ergeben, wenn ein Teil der zu untersuchenden aflatoxinhaltigen Probe "toxinfrei" gemacht werden kann und der andere Teil unverändert untersucht wird. Durch Zugabe spezifischer Antikörper wird das Toxin in dem einen Teil neutralisiert und somit der enzymimmuno-

logischen Bestimmung entzogen. Im anderen, unbehandelten Teil der Probe bleibt der enzymimmunologisch erfaßbare AFM_1 -Gehalt unverändert. Abb. 4 veranschaulicht das Prinzip dieses Screening Verfahrens.

Das AFM_1 -Molekül wird durch den zur Neutralisierung zugesetzten Antikörper unter Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes gebunden (Abb. 4, Ib+c), so daß die Bindungsstellen des Antikörpers der Festkörperphase (Microeliasplatte), die normalerweise von freiem Toxin besetzt werden, den gebildeten AFM_1 Antigen-Antikörper-Komplex nicht binden können und frei bleiben (Abb. 4, Id+e). Sie werden im nächsten Schritt vom enzymmarkierten Toxin besetzt (Abb. 4, If). Dementsprechend wird mehr Substrat umgesetzt (Abb. 4, Ig) und der ermittelte Toxingehalt der Proben ist um den Anteil des im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen Toxins vermindert. Wenn im Idealfall alle AFM_1 -Moleküle neutralisiert werden, ist kein Toxin nachweisbar, so daß der enzymimmunologische Nachweis von AFM_1 ein negatives Ergebnis ergibt.

Im anderen Teil der Probe (Abb. 4, IIb-d) wird das freie AFM_1 durch den Antikörper gebunden (Abb. 4, IIe), so daß nur wenige Bindungsstellen für das enzymmarkierte Toxin freibleiben (Abb. 4, IIIf). Durch den dadurch bedingten unterschiedlichen Substratumsatz bei den beiden Probenteilen ergeben sich bei der Ermittlung der Extinktionen zwei verschiedene Werte (Abb. 4, I u. IIg).

6.1.3.1.2 Durchführung des Screening-Verfahrens

6.1.3.1.2.1 Reagenzien, Lösungen, Materialien und Geräte

Im folgenden werden die zur Durchführung der angewendeten enzymimmunologischen Nachweisverfahren (auch Abschnitt 6.1.3.2.) notwendigen Reagenzien und Geräte aufgeführt. Sofern keine Angaben über die Herkunft der verwendeten Chemikalien erfolgen,

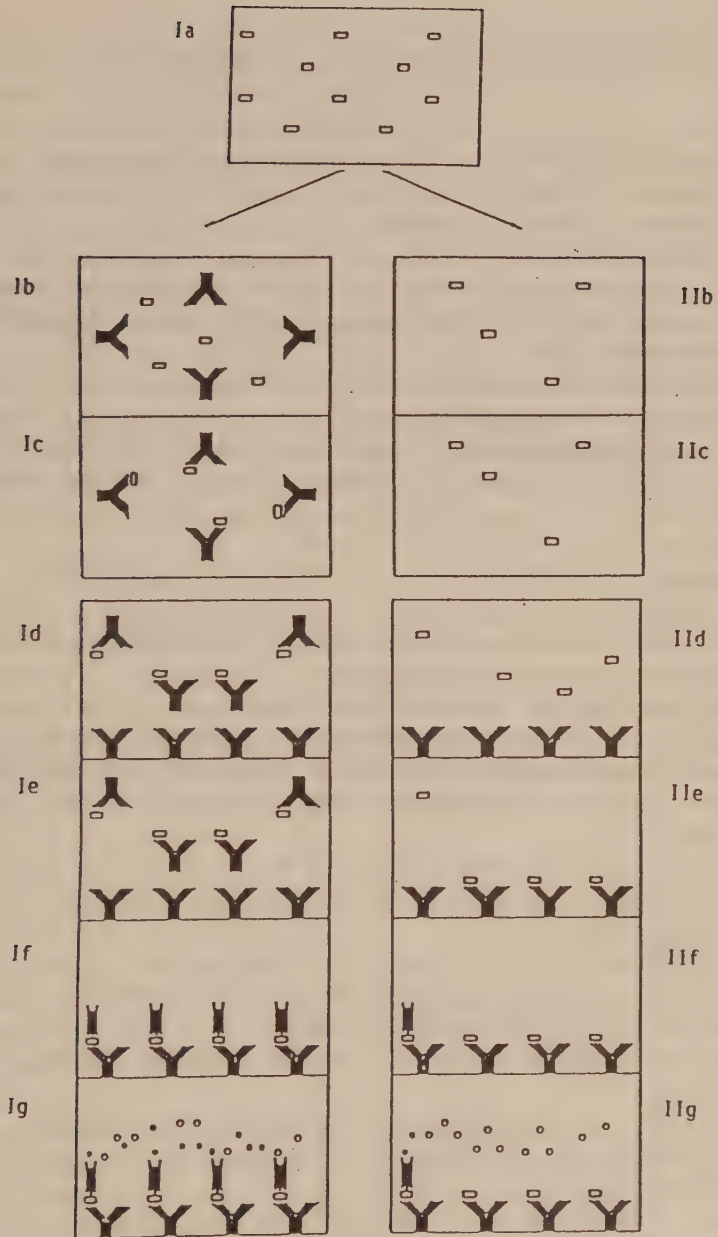


Abb. 4: Prinzip des semiquantitativen Nachweisverfahrens von AFM₁ in Milch

wurden sie von der Firma Merck in der Reinheitsstufe p.A. bezogen.

Folgende Reagenzien und Lösungen kamen zur Anwendung:

- Aflatoxin M₁ (AFM₁), (Sigma)
- Aflatoxin B₁ (AFB₁), (Sigma)
- Enzymmarkiertes AFB₁

In institutseigener Produktion mittels der aktiven Estermethode gewonnenes AFB₁-Meerrettichperoxidase-Konjugat (AFB₁-HRP) (MÄRTLBAUER, 1987).

- Carbonat-Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l, pH 9,4-9,8)
- Anti-AFM₁-Kaninchenantiserum

Das Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem AFM₁-Humanserumalbumin-Konjugat in institutseigener Produktion gewonnen.

- Fetales Kälberserum (FCS), (Sigma)
- Phosphatpuffer (PBS), (0,01 mol/l mit 0,12 mol/l NaCl, pH 7,0-7,5)

Der Puffer wurde nach Zusatz von 1% fetalem Kälberserum (FCS) als 1% FCS/PBS bezeichnet.

- gebrauchsfertige Enzym-Substratlösung
(1 Teil TMB (0,5 ml) und 20 Teile H₂O₂-Puffer (10 ml))
Enzym-Substrat zur Bestimmung der gebundenen Enzymaktivität
(1mmol 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in 5 ml Aceton und 45 ml Methanol)

H₂O₂-Puffer (0,21 mol/l, pH 3,9-4,0)
(lichtgeschützt einige Wochen im Kühlschrank haltbar)

- 1 mol/l H₂SO₄
- Waschlösung
(0,15 mol/l NaCl +0,25 Tween 20 ad 1000ml Aqua dest)
- Sep-pak C₁₈-Kartusche (Waters GmbH)
(zur Probenaufbereitung für den quantitativen ELISA)
- Acetonitril
(in 10%- , 30%- und 100% iger Lösung (in Aqua dest.))
- Handelsübliche, entrahmte Milch (0,3% Fett)
- Natriumazid

(zur Konservierung von Milchuntersuchungsproben,
0,018-0,023 % (g/vol))

Folgende Plastikmaterialien und Geräte wurden verwendet:

- Nunc-Immuno-Platten maxiSorb (Nunc-GmbH)
- Eppendorf Varipipette 4710, 10-100 μ l
- Eppendorf Varipipette 4710, 100-1000 μ l
- Eppendorf Standartips 10-101 μ l und 101-1000 μ l
- Einmal Reagenzgläser (Servopax)
- Rüttler Vortex Genie 2 (Bender und Hobein)
- Tämelgerät (Heidolph)
- Micro ELISA-Autoreader MR 580 (Dynatech)
- Personal-Computer HP 85 B (Hewlett-Packard)
- Präzisionswaage (Satorius)
- Photometer Shimadzu UV 160 (Shimadzu Corporation)
- Kühlzentrifuge Variofuge RF (Haeraeus-Christ-GmbH)
- Tiefgefrierschrank Leros Scientific (New Brunswick Scientific)
- Gefriertrocknungsanlage GT 2 (Leybold-Haeraeus)

Das anti-AFM₁-Antiserum wurde in Portionen zu 0,5 ml lyophyliert und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Zur Anwendung wurde es mit 0,5 ml Aqua dest. gelöst. Nicht verbrauchte Antiserum-Lösung wurde wieder eingefroren. Die zur Beschichtung der Microelisaplatte hergestellte Vorverdünnung (1:100 in PBS) wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Untersuchungen wurden mit Antiserum der Chargen AS II₁₅ und AS III₁₅ durchgeführt.

Das AFB₁ Meerrettichperoxidase-Konjugat wurde nach 1:100 Vorverdünnung mit 1% FCS/PBS ebenfalls in Portionen von 0,5 ml lyophilisiert und im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Innerhalb von 8 Tagen nicht aufgebrauchte Konjugat-Lösungen wurden wieder eingefroren. Das gelöste Konjugat wurde 1:400 mit 1% FCS/PBS weiterverdünnt, so daß eine Endverdünnung von 1:40.000 erreicht wurde.

Zur Herstellung der verschiedenen Toxinstandards wurde die AFM₁-Stammlösung (20 μ g AFM₁/ml) verwendet. Die Toxinkonzentration des in Methanol gelösten AFM₁ wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten kontrolliert:

$$x = \frac{E_{\max} \times M \times 1000}{\epsilon \times \delta}$$

$E_{\max}$ = aus der Absorptionskurve ermittelter maximaler Extinktionswert im Bereich 330-335 nm

M = molare Masse von AFM_1 (328)

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient von AFM_1 in Methanol (19.000)

δ = Schichtdicke der Mikroküvette in cm

x = AFM_1 -Gehalt

Die Stammlösung wurde im Kühlschrank bei 4 °C lichtgeschützt in Braunglasflaschen gelagert und die Toxinkonzentration in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

6.1.3.1.2.2 Methodik

Das semiquantitative Nachweisverfahren wurde folgendermaßen durchgeführt:

Ausgehend von der AFM_1 -Standardlösung wurden vier Standardkonzentrationen mit einem Gehalt von 0, 10, 20 und 50 ng/l (Standard 1, 2, 3, 4) in entrahmter, mit Natriumazid konservierter AFM_1 -freier Milch hergestellt. Die Standardlösungen und Proben wurden nach einem festgelegten Schema jeweils auf zwei Kavitäten einer unbeschichteten Microelisaplatte aufgeteilt und parallel zueinander aufgetragen. Pro Toxinkonzentration erfolgten zwei, pro Probe drei Parallelansätze. In jede Kavität wurden 225 µl Rohmilch bzw. Toxinstandard pipettiert. Zu dem Teil der Probe, in der das AFM_1 neutralisiert werden sollte, wurden 25 µl einer 1:100 anti- AFM_1 -Antiserumverdünnung pipettiert. Zu dem Teil, in dem der Toxingehalt unverändert bleiben sollte, wurden 25 µl PBS gegeben. Die rechten und linken Randreihen (1 u. 12) der Microelisaplatte wurden nicht benutzt (Abb. 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	●	○	○	●	○	●	○	●	○	○	○
B	○	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
C	○	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 5: Pipettierschema für die Microelisplatte

A,B; 2= Standard 1 + PBS (●)	A,B,C; 4= Probe 1 + PBS (●)
A,B; 3= Standard 1 + AS (○)	A,B,C; 5= Probe 1 + AS (○)
C,D; 2= Standard 2 + PBS (●)	D,E,F; 4= Probe 2 + PBS (●)
C,D; 3= Standard 2 + AS (○)	D,E,F; 5= Probe 2 + AS (○)
E,F; 2= Standard 3 + PBS (●)	usw.
E,F; 3= Standard 3 + AS (○)	
G,H; 2= Standard 4 + PBS (●)	
G,H; 3= Standard 4 + AS (○)	

Standard 1: 0 ng AFM₁/l
Standard 2: 10 ng AFM₁/l
Standard 3: 20 ng AFM₁/l
Standard 4: 50 ng AFM₁/l

Danach wurde die Platte über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Zweckmäßigerweise erfolgte die Vorinkubation in einer unbeschichteten Microelisplatte. So konnte das Überpipettieren in die beschichtete Testplatte mit einer 12-Kanalpipette erfolgen. Dadurch wurde der Zeitaufwand reduziert und Pipettierfehler konnten weitgehend eliminiert werden. Parallel dazu wurde das anti-AFM₁-Antiserum mit dem Carbonat-Bicarbonatpuffer 1:8000 verdünnt. Davon wurden je 100 µl in die Kavitäten einer Microelisplatte (Nunc-GmbH) pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend ausgeschlagen. Zur Absättigung wurden in jede Kavität 200 µl entrahmte Milch pipettiert und die

Platte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Taumelgerät (Heidolph) inkubiert. Nach 30-40 Minuten wurde die Platte dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Nunmehr wurden die in der Zwischenzeit vorinkubierten Proben- und Standardpaare (Probe bzw. Standard + PBS sowie Probe bzw. Standard + anti-AFM₁-Antiserumverdünnung) ohne weitere Aufbereitung nach einem festgelegten Schema auf die mit anti-AFM₁-Antiserum beschichtete Microelisaplatte pipettiert (100 µl/Kavität), 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf einem Taumelgerät inkubiert und anschließend abgesaugt. Die Platte wurde wieder dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Daraufhin wurden in jede Kavität 100 µl AFB₁-HRP, das vorher mit 1% FCS/PBS 1:40000 verdünnt worden war, pipettiert und die Platte wieder unter den vorgenannten Bedingungen inkubiert, dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Das Enzymsubstrat wurde zugegeben (100 µl/Kavität), nach ausreichender Farbentwicklung (15-30 min.) die Reaktion mit 100 µl 1 mol/l H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Der Extinktionswert der toxinfreien Milchprobe (Nullwert) wurde 100% gesetzt, während der Extinktionswert des mit der 1:100 anti-AFM₁-Antiserumverdünnung vorinkubierten Probenanteils (100%) 100% gesetzt und der Wert des mit PBS inkubierten Probenanteiles in prozentuale Beziehung zueinander gesetzt wurden (relative Extinktion = r.E.%). Mit steigendem Toxingehalt steigt die Differenz der errechneten r.E.% -Werte der Milchproben zum Nullwert. Die Schätzung des AFM₁-Gehaltes der Proben wurde durch den Vergleich der ermittelten relativen Extinktionen mit den Werten der gleichzeitig angesetzten Standards durchgeführt. Dazu wurde ein Auswertungsschema erstellt. Ausgehend von den vier für die Standards errechneten relativen Extinktionswerten (r.E.₀%, r.E.₁₀%, r.E.₂₀%, r.E.₅₀%) wurden acht Extinktionsintervalle festgelegt und jedem Intervall eine bestimmte AFM₁-Konzentration zugeordnet (HEUSEL, 1987) (Tab. 11).

Tab. 11: Auswertungsschema für die Bestimmung
des AFM₁-Gehaltes in Milch (nach Heusel, 1987)

Extinktionsintervall			AFM ₁ -Konzentration
I	r.E. ₀ %	±3	= 0 pg AFM ₁ /ml
II	r.E. ₀ %	-3,1 - r.E. ₁₀ % +3,1	= <10 pg AFM ₁ /ml
III	r.E. ₁₀ %	±3	= 10 pg AFM ₁ /ml
IV	r.E. ₁₀ %	-3,1 - r.E. ₂₀ % +3,1	= >10 pg AFM ₁ /ml
			= <20 pg AFM ₁ /ml
V	r.E. ₂₀ %	±3	= 20 pg AFM ₁ /ml
VI	r.E. ₂₀ %	-3,1 - r.E. ₅₀ % +3,1	= >20 pg AFM ₁ /ml
			= <50 pg AFM ₁ /ml
VII	r.E. ₅₀ %	±3	= 50 pg AFM ₁ /ml
VIII	r.E. ₅₀ %	-3,1 -	= >50 pg AFM ₁ /ml

Die relative Extinktion (r.E.%) der einzelnen Probenpaare wurde dem entsprechenden Intervall zugeordnet und der geschätzte AFM₁-Gehalt angegeben (Tab. 12).

Pro Tag konnten mit diesem Verfahren 9 Platten mit insgesamt 99 Proben untersucht werden.

Anhand der mittels der prozentualen Extinktionswerte geschätzten AFM₁-Gehalte wurden die Aflatoxin-positiven Milchproben (geschätzter AFM₁-Gehalt > 10 ng/l) selektiert und bis zur quantitativen Bestimmung bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tab. 12: Auswertungsprotokoll des semiquantitativen Nachweisverfahrens

-relative Extinktion (r.E.%) der Standards:

1. 0 pg AFM₁/ml : 98,6%
2. 10 pg AFM₁/ml : 74,0%
3. 20 pg AFM₁/ml : 53,2%
4. 50 pg AFM₁/ml : 31,5%

-Auswertungsschema:

Extinktionsintervall	zugeordnete AFM ₁ -Konzentration
I 101,6 -95,6%	= 0 pg AFM ₁ /ml
II 95,5% -77,1%	= <10 pg AFM ₁ /ml
III 77,0% -71,0%	= 10 pg AFM ₁ /ml
IV 70,9% -56,3%	= >10 pg AFM ₁ /ml
	= <20 pg AFM ₁ /ml
V 56,2% -50,2%	= 20 pg AFM ₁ /ml
VI 50,1% -34,6%	= >20 pg AFM ₁ /ml
	<50 pg AFM ₁ /ml
VII 34,5% -28,5%	= 50 pg AFM ₁ /ml
VIII >28,4%	= >50 pg AFM ₁ /ml

6.1.3.2 Quantitatives Verfahren zum Nachweis von AFM₁ in Milch

Die quantitative Bestimmung des AFM₁ in den vorselektierten Milchproben wurde mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen Nachweisverfahren für AFM₁ in Milch und Milchpulver durchgeführt. Als Reagenzien und Geräte wurden die unter 6.1.3.1.2.1. aufgeführten Materialien verwendet.

6.1.3.2.1 Probenaufbereitung

3 ml Milch wurden mit Aqua dest. auf 10 ml verdünnt. Eine Sep-pak C₁₈-Kartusche wurde mit 10 ml Aqua dest., 10 ml Acetonitril und nochmals 10 ml Aqua dest. gewaschen. Dann wurde die verdünnte Milchprobe durch die Kartusche gedrückt und mit 5 ml Aqua dest. und 18-20 ml 10 % Acetonitril in Aqua dest. nachgespült. AFM₁ wurde mit 5 ml 30 % Acetonitril in Aqua dest. eluiert, lyophilisiert und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zur Bestimmung des AFM₁-Gehaltes wurde das Lyophilisat je nach zu erwartenden Konzentrationen in 1,5 ml (bis zu 20 ng/l) oder in 3 ml (bei >20 ng/l) PBS/10 % Methanol gelöst.

6.1.3.2.2 Enzymimmunologischer Nachweis

Der heterologe, konsekutive ELISA wurde wie folgt durchgeführt: das anti-AFM₁-Antiserum wurde mit Carbonat-Bicarbonatpuffer (0,05 mol/l pH 9,6) 1:6000 verdünnt. Davon wurden je 100 µl in die Kavitäten einer Microelisaplatte (Nunc-GmbH) pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend ausgeschlagen. Zur Absättigung wurden in jede Kavität 200 µl entrahmte Milch gegeben und die Platte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur 30-40 Minuten auf einem Taumler inkubiert. Dann wurde die Platte dreimal gewaschen und ausgeschlagen. Daraufhin wurden die Standardlösungen und die Proben (100 µl/Kavität) zugegeben, die Platte unter den oben genannten Bedingungen 60 min inkubiert, die Proben abgesaugt und die Platte wieder gewaschen. Anschließend wurden in jede Kavität 100 µl AFB₁ Meerrettichperoxidase-Konjugat, das vorher mit 1 % FCS/PBS 1:30.000 verdünnt worden war, pipettiert und die Platte wieder wie oben angegeben 60 Minuten inkubiert und gewaschen. Das Enzymsubstrat wurde zugegeben (100 µl/Kavität), nach ausreichender Farbentwicklung (15-30 min.) die Reaktion mit 100 µl 1 mol/l H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion bei 450 nm gemessen.

Der mit dem ELISA-Autoreader verbundene Computer berechnete aus je vier Parallelwerten für Standards und Proben deren Mittelwerte

und Standardabweichung. Aus den Mittelwerten der Toxinstandards wurde eine Standardkurve erstellt und die Probenkonzentration durch Interpolation ermittelt.

Bei dem heterologen, kompetitiven Elisa ist der ermittelte Extinktionswert umgekehrt proportional der Toxinkonzentration.

7

Ergebnisse

7.1

Gesamtergebnis aller untersuchten Milchproben

Im Zeitraum von Mai 1987 bis April 1988 wurden insgesamt 6445 Bestandsmilchproben aus vier verschiedenen Regionen Bayerns auf ihren AFM_1 -Gehalt untersucht.

Von den insgesamt 6445 untersuchten Proben waren 624 (9,6 %) positiv (> 10 ng/l). Davon wiesen 612 (9,5 %) AFM_1 -Gehalte zwischen 10-50 ng/l auf, 12 (0,2 %) über 50 ng/l und 224 (3,5 %) über 20 ng/l.

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Herkunftsgebiete ergab sich folgende Zusammensetzung:

Kempton: von 1465 Proben waren 142 (9,6 %) positiv.

München: von 1533 Proben waren 35 (2,3 %) positiv.

Regensburg: von 1697 Proben waren 104 (6,1 %) positiv.

Schweinfurt: von 1750 Proben waren 343 (19,6 %) positiv.

Die jahreszeitliche Verteilung und der Anteil der einzelnen Gebiete am Gesamtergebnis sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Jahreszeitliche Verteilung aller AFM₁-positiven Bestandsmilchproben insgesamt und in den Herkunftsgebieten

Monat	Probenzahl gesamt	positiv gesamt (%)	positiv (%) in den Herkunftsgebieten *			
			K	M	R	S
Mai	670	52 (7,7)	14 (2,1)	5 (0,7)	10 (1,5)	23 (3,5)
Juni	497	73 (14,6)	22 (4,4)	7 (1,4)	28 (5,6)	16 (3,2)
Juli	343	49 (14,2)	7 (2,0)	6 (1,7)	7 (2,0)	29 (8,5)
August	249	7 (2,8)	3 (1,2)	-	-	4 (1,6)
September	350	17 (4,8)	5 (1,4)	-	6 (1,7)	6 (1,7)
Oktober	649	38 (5,9)	7 (1,1)	-	11 (1,7)	20 (3,1)
November	600	46 (7,6)	9 (1,5)	-	8 (1,3)	29 (4,8)
Dezember	450	32 (7,1)	11 (2,4)	1 (0,2)	3 (0,7)	17 (3,8)
Januar	450	40 (8,8)	10 (2,2)	-	10 (2,2)	20 (4,4)
Februar	699	92 (11,7)	14 (2,0)	3 (0,4)	8 (1,1)	57 (8,2)
März	742	104 (14,0)	25 (3,4)	8 (1,1)	11 (1,5)	60 (8,0)
April	746	84 (11,3)	15 (2,0)	5 (0,7)	2 (0,3)	62 (8,3)
gesamt	6445	624 (9,6)	142 (2,2)	35 (0,5)	104 (1,6)	343 (5,3)

* K =Kempten; M =München; R =Regensburg; S =Schweinfurt.

Die in Klammern angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die im jeweiligen Monat insgesamt untersuchten Probenzahlen.

In Abb. 6 ist die prozentuale jahreszeitliche Verteilung einschließlich der durchschnittlichen AFM₁-Konzentrationen positiver Proben bezogen auf den jeweiligen Monat dargestellt.

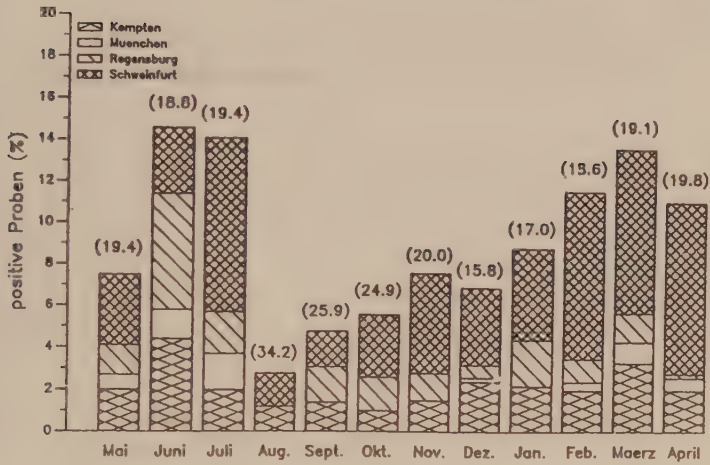


Abb. 6: 1987/88 durchgeführte Untersuchung zur jahreszeitlichen Verteilung AFM₁-haltiger Milchproben in vier Regionen Bayerns; Werte in Klammern = durchschnittlicher AFM₁-Gehalt (ng/l) der positiven Proben

Unterschiede im Hinblick auf die Häufigkeit AFM_1 haltiger Proben und die Konzentrationen im jahreszeitlichen Verlauf verdeutlicht Tab. 14.

Tab. 14: AFM_1 -Konzentrationsunterschiede (ng/l) im jahreszeitlichen Verlauf; Nachweisgrenze 10 ng/l

Monat	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	x_{min}	x_{max} ng/l	x_A^*
Mai	670	52 (7,7)	10,0	65,8	19,4
Juni	497	73 (14,8)	10,0	64,3	18,8
Juli	343	49 (14,3)	10,0	42,5	19,4
August	249	7 (2,8)	10,0	42,4	34,2
September	350	17 (4,9)	10,0	48,8	25,9
Oktober	649	38 (5,9)	10,0	65,2	24,9
November	600	46 (7,7)	10,0	68,9	20,0
Dezember	450	32 (7,1)	10,0	28,3	15,8
Januar	450	40 (8,9)	10,0	58,1	17,0
Februar	699	82 (11,7)	10,0	68,9	18,6
März	742	104 (14,0)	10,0	54,7	19,1
April	746	84 (11,3)	10,0	58,1	19,8
gesamt	6445	624 (9,6)	10,0	68,9	21,1

x_A^* :arithmetisches Mittel

Tab. 15 beschreibt die Anzahl der Proben in drei verschiedenen Konzentrationsbereichen im jahreszeitlichen Verlauf.

Tab. 15: Probenanzahl in drei Konzentrationsbereichen
im jahreszeitlichen Verlauf

Monat	Proben gesamt	AFM ₁ Konzentrationsbereich in ng/l		
		10-20	20-50	>50
Mai	670	36	15	1
Juni	497	51	21	1
Juli	343	29	20	0
August	249	0	7	0
September	350	7	10	0
Oktober	649	16	20	2
November	600	27	17	2
Dezember	450	25	7	0
Januar	450	34	4	2
Februar	699	55	26	1
März	742	70	32	2
April	746	50	33	1
gesamt	6445	400 (6,2%)	212 (3,3%)	12 (0,2%)

Unterschiede entsprechend im AFM₁-Vorkommen und -Gehalt bei "Sommer-" (Mai-Okt.) und "Wintermilch" (Nov.-April) sind aus Tab. 16 ersichtlich.

Tab. 16: Häufigkeit und Konzentrationen von AFM₁ in
Bestandsmilch in Abhängigkeit von der
Jahreszeit; Nachweisgrenze 10 ng/l
Sommer: Mai-Okt.; Winter: Nov.-April.

Zeitraum	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Sommer	2758	236 (8,6)	10,0	65,8	19,4
Winter	3687	388 (10,5)	10,0	68,9	21,6

x_A^* : arithmetisches Mittel

Die maximale AFM_1 -Konzentration in der "Sommermilch" betrug 65,8 ng/l; die der "Wintermilch" 68,9 ng/l. Entsprechende Unterschiede liegen auch in den Durchschnittswerten vor.

7.1.1 Proben aus dem Einzugsgebiet Kempton (Weidegebiet)

Aus dem Einzugsgebiet Kempton kamen insgesamt 1465 Bestandsmilchproben zur Untersuchung, von denen in 142 (9,6%) AFM_1 -Gehalte festgestellt werden konnten. Einen Überblick über die jahreszeitliche Verteilung und die aufgetretenen Konzentrationen der AFM_1 -positiven Proben gibt Tab. 17.

Tab. 17: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von Aflatoxin M_1 in Bestandsmilch aus dem Einzugsgebiet Kempton; Nachweisgrenze 10 ng/l; Mai 1987 - April 1988

Monat	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Mai	184	14 (7,6)	10,4	35,6	17,1
Juni	98	22 (22,4)	11,0	46,5	19,3
Juli	94	7 (7,4)	10,0	42,4	23,2
August	50	3 (6,0)	22,8	42,4	34,3
September	100	5 (5,0)	25,0	42,4	35,0
Oktober	149	7 (4,7)	13,8	65,2	33,1
November	100	9 (9,0)	10,5	20,3	13,8
Dezember	100	11 (11,0)	10,2	28,3	15,8
Januar	100	10 (10,0)	10,0	20,4	13,1
Februar	150	14 (9,3)	10,2	31,0	19,2
März	193	25 (13,0)	10,2	54,7	17,3
April	147	15 (10,2)	10,0	26,9	15,6
gesamt	1465	142 (9,6)	10,0	65,2	21,4

x_A^* : arithmetisches Mittel

Anzahl und Verteilung der Proben in drei verschiedenen Konzentra-

tionsbereichen ergeben sich aus Tab. 18.

Tab. 18: Probenanzahl in drei Konzentrationsbereichen
im jahreszeitlichen Verlauf im Einzugsgebiet Kempton

Monat	Proben gesamt	AFM ₁ -Konzentrationen in ng/l		
		10-20	20-50	>50
Mai	184	11	3	0
Juni	98	15	7	0
Juli	94	3	4	0
August	50	0	3	0
September	100	0	5	0
Oktober	149	3	2	2
November	100	8	1	0
Dezember	100	8	3	0
Januar	100	10	0	0
Februar	150	7	7	0
März	193	21	3	1
April	147	12	3	0
gesamt	1465	98 (6,7%)	41 (2,8%)	3 (0,2%)

Das Ergebnis der Untersuchung bezüglich "Sommer-" und "Wintermilch" ist aus Tab. 19 ersichtlich.

Tab. 19: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von AFM₁ in
Bestandsmilch des Einzugsgebietes Kempton in
Abhängigkeit von der Jahreszeit; Nachweisgrenze 10 ng/l
Sommer: Mai - Okt.; Winter: Nov. - April

Zeitraum	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Sommer	675	58 (8,6)	10,0	65,2	27,0
Winter	790	84 (10,6)	10,0	54,7	15,8

x_A^* : arithmetisches Mittel

Die maximale AFM_1 -Konzentration der "Somtermilch" betrug 65,2 ng/l; die der "Wintermilch" 54,7 ng/l. Auch die Durchschnittswerte liegen im Winter niedriger.

7.1.2 Proben aus dem Einzugsgebiet München (Mischgebiet)

Aus dem Einzugsgebiet München kamen insgesamt 1533 Bestandsmilchproben zur Untersuchung, von denen in 35 (2,3%) AFM_1 -Gehalte festgestellt werden konnten. Einen Überblick über die jahreszeitliche Verteilung und die aufgetretenen Konzentrationen der AFM_1 -positiven Proben gibt Tab. 20.

Tab. 20: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von Aflatoxin M_1 in Bestandsmilch aus dem Einzugsgebiet München;
Nachweisgrenze 10 ng/l
Mai 1987 - April 1988

Monat	Proben gesamt	positiv Anzahl (%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Mai	187	5 (2,7)	11,2	14,5	12,7
Juni	99	7 (7,1)	12,6	31,0	18,6
Juli	99	6 (6,1)	11,5	23,3	26,5
August	99	0	-	-	-
September	50	0	-	-	-
Oktober	150	0	-	-	-
November	100	0	-	-	-
Dezember	150	1 (0,7)	10,0	10,0	10,0
Januar	100	0	-	-	-
Februar	150	3 (2,0)	13,8	26,4	18,1
März	149	8 (5,4)	10,2	31,7	16,9
April	200	5 (2,5)	10,7	20,9	14,6
gesamt	1533	35 (2,3)	10,0	31,7	16,8

x_A^* : arithmetisches Mittel

Anzahl und Verteilung der Proben in drei Konzentrationsbereichen sind in Tab. 21 festgehalten.

Tab. 21: Probenanzahl in drei AFM₁-Konzentrationsbereichen im jahreszeitlichen Verlauf im Einzugsgebiet München

Monat	Proben gesamt	AFM ₁ -Konzentrationen in ng/l		
		10-20	20-50	>50
Mai	187	5	0	0
Juni	99	6	1	0
Juli	99	4	2	0
August	99	0	0	0
September	50	0	0	0
Oktober	150	0	0	0
November	100	0	0	0
Dezember	150	1	0	0
Januar	100	0	0	0
Februar	150	2	1	0
März	149	6	2	0
April	200	4	1	0
gesamt	1533	28 (1,8%)	7 (0,5%)	0

Das Ergebnis bezüglich "Sommer-" und "Wintermilch" ist aus Tab. 22 ersichtlich.

Tab. 22: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von AFM_1 in Bestandsmilch des Einzugsgebietes München in Abhängigkeit von der Jahreszeit; Nachweisgrenze 10 ng/l
Sommer: Mai - Okt; Winter: Nov. - April

Zeitraum	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Sommer	684	18 (2,6)	11,2	31,0	15,9
Winter	849	17 (2,0)	10,0	31,7	13,1

x_A^* : arithmetisches Mittel

Die maximale AFM_1 -Konzentration der "Sommermilch" betrug 31,0 ng/l; die der "Wintermilch" 31,7 ng/l. Dagegen lagen die Durchschnittswerte im Winter niedriger als im Sommer.

7.1.3 Proben aus dem Einzugsgebiet Regensburg (Mischgebiet)

Aus dem Einzugsgebiet Regensburg wurden 1697 Bestandsmilchproben untersucht, von denen in 104 (6,1%) AFM_1 -Gehalte festgestellt werden konnten. Einen Überblick über die jahreszeitliche Verteilung und die aufgetretenen Konzentrationen der AFM_1 -positiven Proben gibt Tab. 23.

Tab. 23: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von Aflatoxin M₁
in Bestandsmilch aus dem Einzugsgebiet Regensburg;
Nachweisgrenze 10 ng/l
Mai 1987 - April 1988

Monat	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	x _{min}	x _{max} ng/l	x _A [*]
Mai	149	10 (6,7)	10,0	34,4	22,4
Juni	200	28 (14,0)	10,0	35,3	17,5
Juli	50	7 (14,0)	11,2	26,7	19,1
August	50	0	-	-	-
September	100	6 (6,0)	19,4	48,8	26,3
Oktober	150	11 (7,3)	11,5	44,4	26,9
November	200	8 (4,0)	10,7	68,9	28,6
Dezember	100	3 (3,0)	11,6	25,2	16,5
Januar	150	10 (6,7)	11,0	58,1	26,6
Februar	149	8 (5,3)	10,2	39,6	23,6
März	200	11 (5,5)	10,0	53,5	31,3
April	199	2 (1,0)	10,7	27,0	18,8
gesamt	1697	104 (6,1)	10,0	68,9	23,4

x_A^{*}: arithmetisches Mittel

Anzahl und Verteilung der Proben in drei Konzentrationsbereichen
sind in Tab. 24 aufgeführt.

Tab. 24: Probenanzahl in drei AFM_1 -Konzentrationsbereichen
im jahreszeitlichen Verlauf im Einzugsgebiet
Regensburg

Monat	Proben gesamt	AFM ₁ -Konzentrationen in ng/l		
		10-20	20-50	>50
Mai	149	6	4	0
Juni	200	20	8	0
Juli	50	4	3	0
August	50	0	0	0
September	100	2	4	0
Oktober	150	4	7	0
November	200	4	2	2
Dezember	100	2	1	0
Januar	150	6	2	2
Februar	149	3	5	0
März	200	2	8	1
April	199	1	1	0
gesamt	1697	54 (3,2%)	45 (2,7%)	5 (0,3%)

Das Ergebnis bezüglich "Sommer-" und "Wintermilch" ist in
Tab. 25 festgehalten.

Tab. 25: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von AFM_1 in
Bestandsmilch des Einzugsgebietes Regensburg in
Abhängigkeit von der Jahreszeit; Nachweisgrenze 10 ng/l
Sommer: Mai - Okt; Winter: Nov. - April

Zeitraum	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Sommer	699	62 (8,9)	10,0	48,8	22,4
Winter	998	42 (4,2)	10,0	68,9	24,2

x_A^* : arithmetisches Mittel

Die maximale AFM₁-Konzentration der "Sommermilch" betrug 48,8 ng/l; die der "Wintermilch" 68,9 ng/l. Auch die Durchschnittswerte lagen im Sommer niedriger.

7.1.4 Proben aus dem Einzugsgebiet Schweinfurt
(Ackerbaugebiet)

Aus dem Einzugsgebiet Schweinfurt kamen insgesamt 1750 Bestandsmilchproben zur Untersuchung, von denen in 343 (19,6%) AFM₁-Gehalte festgestellt werden konnten. Einen Überblick über die jahreszeitliche Verteilung und die aufgetretenen Konzentrationen der AFM₁-positiven Proben gibt Tab. 26.

Tab. 26: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von Aflatoxin M₁ in Bestandsmilch aus dem Einzugsgebiet Schweinfurt;
Nachweisgrenze 10 ng/l
Mai 1987 - April 1988

Monat	Proben gesamt	positiv Anzahl (%)	x _{min}	x _{max} ng/l	x _A [*]
Mai	150	23 (15,3)	10,2	65,8	21,0
Juni	100	16 (16,0)	10,7	64,3	20,6
Juli	100	29 (29,0)	10,5	42,5	18,4
August	50	4 (8,0)	24,4	41,4	34,2
September	100	6 (6,0)	10,7	28,0	17,9
Oktober	200	20 (10,0)	10,0	35,2	20,8
November	200	29 (14,5)	10,0	35,6	19,5
Dezember	100	17 (17,0)	10,0	22,2	16,0
Januar	100	20 (20,0)	10,0	24,4	14,1
Februar	250	57 (22,8)	10,0	68,9	17,8
März	200	60 (30,0)	10,0	36,4	18,0
April	200	62 (31,0)	10,2	58,1	21,3
gesamt	1750	343 (19,6)	10,0	68,9	20,0

x_A^{*}: arithmetisches Mittel

Anzahl und Verteilung der Proben in drei Konzentrationsbereichen sind aus Tab. 27 ersichtlich.

Tab. 27: Probenanzahl in drei AFM_1 -Konzentrationsbereichen im jahreszeitlichen Verlauf im Einzugsgebiet Schweinfurt

Monat	Proben gesamt	AFM_1 -Konzentrationen in ng/l		
		10-20	20-50	>50
Mai	150	14	8	1
Juni	100	10	5	1
Juli	100	18	11	0
August	50	0	4	0
September	100	5	1	0
Oktober	200	9	11	0
November	200	15	14	0
Dezember	100	14	3	0
Januar	100	18	2	0
Februar	250	43	13	1
März	200	41	19	0
April	200	33	28	1
gesamt	1750	220 (12,6%)	119 (6,8%)	4 (0,2%)

Das Ergebnis der Untersuchung bezüglich "Sommer-" und "Wintermilch" ist in Tab. 28 dargestellt.

Tab. 28: Häufigkeit und Konzentrationen (ng/l) von AFM_1 in Bestandsmilch des Einzugsgebietes Schweinfurt in Abhängigkeit von der Jahreszeit; Nachweisgrenze 10 ng/l
Sommer: Mai - Okt.; Winter: Nov. - April 1988

Zeitraum	Proben gesamt	positiv Anzahl(%)	$x_{\min}$	$x_{\max}$ ng/l	x_A^*
Sommer	700	98 (14,0)	10,0	65,8	22,1
Winter	1050	245 (23,3)	10,0	68,9	17,7

x_A^* : arithmetisches Mittel

Die maximale AFM_1 -Konzentration der "Sommermilch" betrug 65,8 ng/l; die der "Wintermilch" 68,9 ng/l. Die Durchschnittswerte lagen im Winter niedriger als im Sommer.

Die Aflatoxine gehören zu den stärksten karzinogenen und mutagenen Mykotoxinen, die auch als Rückstände in Lebensmitteln vorkommen und ein gesundheitliches Risiko bedingen.

Diese Stoffwechselprodukte verschiedener Aspergillusarten können überall dort auftreten, wo Umweltbedingungen das Wachstum dieser Schimmelpilze ermöglichen. Häufig sind Pflanzen, im besonderen deren Samen, die zu Futterzwecken verwendet werden, betroffen. Hierbei sind importierte Futtermittel aus tropischen und subtropischen Ländern von besonderer Bedeutung. Grundsätzlich können jedoch auch wirtschaftseigene Futtermittel wie verschimmelte Silagen aflatoxinhaltig sein (KIERMEIER et al., 1975). Diese spielen allerdings bezüglich der Aflatoxin-Kontamination der Milch nur eine untergeordnete Rolle (HEESCHEN et al., 1983). Die fast ausschließliche Kontaminationsquelle für die Milch mit AFM_1 sind mit AFB_1 kontaminierte Importfuttermittel. Im Organismus der laktierenden Kuh wird AFB_1 metabolisiert und zum Teil als AFM_1 über die Milch ausgeschieden.

Da akute Vergiftungen durch Aflatoxine selten vorkommen, steht die chronische Gesundheitsschädigung von Mensch und Tier im Vordergrund. Am stärksten sind Säuglinge und Kleinkinder aufgrund ihres geringen Körpergewichtes und der überwiegenden Ernährung durch Milch und Milchprodukte gefährdet, weil sich daraus eine überdurchschnittlich hohe AFM_1 -Exposition ergibt.

Diese wirkt sich zudem im noch im Wachstum befindlichen jugendlichen Organismus durch das erhöhte Zellteilungs- und Zellvergrößerungsrate verstärkt aus.

In der am 1. März 1977 in Kraft getretenen Aflatoxin-Verordnung (Verordnung über Höchstmengen an Aflatoxinen in Lebensmitteln) sind Höchstmengen für AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 und AFG_2 in bestimmten pflanzlichen Lebensmitteln festgelegt. Milch und Milcherzeugnisse werden nicht berücksichtigt.

In einem Entwurf zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung wird jetzt auch eine Reglementierung für AFM_1 in Milch und Milchprodukten angestrebt. Danach soll Milch weder unvermischt noch nach

Vermischen als Lebensmittel in Verkehr gebracht oder zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet werden, wenn sie mehr als 50 ng AFM₁/l enthält. Milch, die zur Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung verwendet wird, soll nicht mehr als 10 ng AFM₁/l enthalten dürfen. Milcherzeugnisse dürfen nicht aus Milch, deren Gehalt an AFM₁ 50 ng/l bzw. 10 ng/l (für Säuglingsnahrung) überschreitet, hergestellt werden. Während einer Übergangszeit von zwei Jahren soll der Grenzwert für Milch, die zur Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung verwendet wird, auf 20 ng AFM₁/l festgelegt werden.

Voraussetzung für die praktische Durchführung und Kontrolle der gesetzlich festzulegenden Höchstmengenregelung für AFM₁ in Milch und Milchprodukten sind geeignete Nachweisverfahren. Diese müssen auch noch geringste AFM₁-Konzentrationen erfassen, dabei aber auch schnell, einfach und preisgünstig durchzuführen sein, da bei den zu erwartenden Probenzahlen ein enormer Arbeitsaufwand auf die zur Untersuchung und Kontrolle eingesetzten Labors zukommt. Wegbereitend für die mögliche Durchführung dieser notwendigen Kontrollen war die Entwicklung enzymimmunologischer Analyseverfahren (PESTKA et al., 1981; MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985). Als Vorteil der Enzymimmunoassays zum Nachweis von AFM₁ in Milch und Milcherzeugnissen gegenüber den bisher hauptsächlich eingesetzten DC- und HPLC-Verfahren gelten vor allem Empfindlichkeit der Testsysteme, Arbeits- und Zeitersparnis bei der Probenaufbereitung, geringerer Verbrauch organischer Lösungsmittel und mögliche Automatisierbarkeit des Tests (MÄRTLBAUER, 1985). Im Vergleich zur amtlichen Methode (§ 35 LMBG) können mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen Nachweisverfahren für AFM₁ in Milch und Milchpulver von einer Arbeitskraft an einem Tag bis zu zehnmal mehr Proben bei einer Nachweisgrenze von ca. 2,5 ppt untersucht werden.

Auf dem Prinzip dieses ELISA baut das von HEUSEL (1987) beschriebene semiquantitative Nachweisverfahren auf. Diese semiquantitative Bestimmung des AFM₁-Gehaltes in Milch ermöglicht, bei gleich niedriger Nachweisgrenze eine Selektierung aller untersuchten Proben in positiv und negativ mit ungefährender Schätzung des AFM₁-Gehaltes. Dadurch können negative Proben sofort eliminiert

werden, ohne einer Zeit- und Materialaufwendigen quantitativen Bestimmung unterzogen werden zu müssen. Bei einem in der vorliegenden Erhebung festgestellten durchschnittlichen negativen Probenanteil von ca. 90 % kommt diese Zeit- und damit verbundene Personal- und Materialersparnis voll zur Geltung. Nur noch die im semiquantitativen Screening-Verfahren als positiv ausgewiesenen Milchproben müssen mit Sep-pak C₁₈-Kartuschen aufbereitet und mit dem von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1985) beschriebenen ELISA untersucht und quantitativ bestimmt werden.

Für die Genauigkeit des Screening-Verfahrens spricht die Kontrolluntersuchung zur Absicherung des Untersuchungsergebnisses. 60 entsprechend dem semiquantitativen Nachweisverfahren negative ($<10 \text{ ng AFM}_1 / \text{kg}$) Proben wurden quantitativ nachuntersucht. In keiner dieser Proben überschritt die AFM_1 -Konzentration 10 ng/kg .

So konnten in der vorliegenden Untersuchung mit dem Screening-Verfahren pro Tag von einer Arbeitskraft 9 Microelisaplaten mit insgesamt 99 Milchproben untersucht werden. (Die Zahl 99 ergibt sich aus dem dreifachen Probenansatz und der zur Verfügung stehenden Kavitätanzahl auf der Microelisaplatte). Da die Errechnung der relativen Extinktionswerte von Hand mittels Taschenrechner erfolgte, könnte bei Verwendung eines geeigneten Computerprogrammes, bei dem die relativen Extinktionen automatisch mitberechnet werden, der damit verbundene Zeitgewinn in die Untersuchung weiterer Milchproben investiert werden. So könnten nach genügender Einarbeitungszeit pro Tag von einer Arbeitskraft ungefähr 150 Milchproben untersucht werden.

Relativ zeitaufwendig ist die Probenaufbereitung mit Sep-pak C₁₈-Kartuschen für die quantitative Bestimmung des AFM_1 -Gehaltes. Doch auch hier können nach ausreichender Einarbeitung von einer Arbeitskraft pro Tag zwischen 60 und 80 Probenaufbereitungen durchgeführt werden. Der zeitintensivste Anteil an der Durchführung dieses ELISA ist die Übertragung der Milchproben und Toxinstandards auf die beschichtete Microelisaplatte, da mit großer Sorgfalt gearbeitet werden muß, um eine auswertbare AFM_1 -Standardkurve zu erhalten. Schon kleinste Ungenauigkeiten bei der Pippettierung können die AFM_1 -Standardkurve verfälschen. Pro Tag

können mit diesem Nachweisverfahren von einer Arbeitskraft bis zu 120 Milchproben untersucht werden.

Die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Ergebnisse für Bayern entsprechen den von KIERMEIER (1985) und HEESCHEN et al. (1986) gemachten Beobachtungen einer relativ geringen Aflatoxinbelastung in Rohmilch und Milchprodukten. So ist das Ergebnis von knapp 10 % positiven Proben als günstig zu bewerten.

Bei Betrachtung aller positiven Proben bezüglich der aufgetretenen Konzentrationen ergibt sich auf den ersten Blick ein ähnlich günstiges Ergebnis, da knapp 2/3 im Bereich von 10-20 ng/l liegen und nur 2 % (0,2 % der untersuchten Proben) Gehalte von 50 ng AFM₁/l übersteigen. Legte man den Übergangswert für Milch zur Herstellung von Säuglings- und Kleinkindernahrung von 20 ng AFM₁/l zugrunde, ist der Anteil von 35,8 % der positiven Proben (3,3 % der untersuchten Proben), die diesen Wert übersteigen, als zu hoch anzusehen.

Zusammenfassend ergibt sich, was das Vorkommen von AFM₁ in Bestandsmilch betrifft, aus dem Gesamtergebnis deshalb ein relativ günstiges Bild. Im Hinblick auf die absoluten Konzentrationen einzelner Proben ist die Beurteilung bezüglich möglicher gesundheitlicher Schädigungen jedoch kritisch zu werten, zumal in zunehmendem Maße Milch ab Hof an Verbraucher abgegeben wird, so daß der Verdünnungseffekt durch negative Milch fehlt. Das, zwar geringe, Vorkommen von AFM₁ in Bestandsmilch trotz der Regulierung der AFB₁-Gehalte in Futtermitteln unterstreicht die Notwendigkeit einer gesetzlichen Einführung von Höchstgrenzen für AFM₁ in Milch und Milchprodukten. Die Bekämpfung der Aflatoxin-Problematik von zwei Seiten, durch das Monitoring sowohl der Futtermittel als auch der Lebensmittel, dürfte den größtmöglichen Gesundheitsschutz für den Menschen darstellen.

Im folgenden sollen nun die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Gebiete betrachtet werden. Da keine Futtermitteluntersuchung durchgeführt wurde und eine Fragebogenaktion nur ungenügende Resonanz hatte, können die Ergebnisse aus den einzelnen Erhebungsgebieten nur ohne nachgewiesenen ursächlichen Zusammenhang zur Aflatoxinkontamination dokumentiert werden. Rückschlüsse auf die Ursachen der teilweise sehr deutlichen Unterschiede bezüglich

AFM₁-Vorkommen und AFM₁-Konzentrationen in den einzelnen Gebieten können deshalb nur hypothetisch unter Zugrundelegung bekannter Tatsachen über das Vorkommen von AFB₁ in Futtermitteln gezogen werden.

Kempton:

Aufgrund des überwiegenden Grünlandanbaus im Raum Kempten und der angenommenen überwiegenden Weidehaltung der Milchkühe wurde in diesem Gebiet die geringste Häufigkeit und Konzentration von AFM₁ in Bestandsmilch erwartet.

Im Vergleich mit den anderen Gebieten ergibt sich jedoch, daß in dieser Region mit 9,6 % das zweithöchste Vorkommen von AFM₁ in Bestandsmilch zu verzeichnen war. Hinsichtlich der mittleren Konzentrationsunterschiede in "Sommer-" und "Wintermilch" konnte in diesem Gebiet die größte Differenz festgestellt werden. (x_A Sommer: 27,0 ng/l; x_A Winter: 15,8 ng/l). Dabei ist zu beachten, daß die absolute Zahl positiver Proben in den Wintermonaten um 2,1 % höher als in den Sommermonaten war. Trotzdem finden sich der maximale AFM₁-Gehalt (Oktober: 65,2 ng/l), die im Monat höchste durchschnittliche AFM₁-Konzentration (September: 35,0 ng/l) und auch der höchste prozentuale Anteil der positiven Proben (Juni: 22,4%) in den Sommermonaten. Anzumerken ist auch, daß von allen positiven Proben nur drei AFM₁-Konzentrationen von über 50 ng AFM₁/l aufwiesen, davon zwei im Oktober und eine im März.

München:

Als Mischgebiet mit teils Grünlandanteil und teils Ackerbaubewirtschaftung wurde im Münchner Raum ein mittleres AFM₁-Vorkommen mit mittleren AFM₁-Konzentrationen erwartet.

Tatsächlich stellt München jedoch nicht nur das Gebiet mit dem geringsten Vorkommen, sondern auch das der geringsten nachgewiesenen Konzentrationen dar. Bemerkenswert hierbei ist, daß nicht nur in drei von sechs untersuchten Sommermonaten, sondern auch in zwei von sechs untersuchten Wintermonaten keine positiven Proben festgestellt werden konnten. Die durchschnittliche Konzentration

in "Sommermilch" lag geringgradig höher als die der "Wintermilch" (x_A : Sommer 15,9 ng/l; x_A : Winter 13,1 ng/l). Ebenso war die Anzahl der in den Sommermonaten festgestellten positiven Proben um 0,6% höher als die der Wintermonate. Bezogen auf den Monat fand sich die höchste durchschnittliche AFM₁-Konzentration mit 26,5 ng/l im Juli, der höchste prozentuale Anteil positiver Proben mit 7,1% im Juni. In keinem Monat überstieg der AFM₁-Gehalt 50 ng/l, jedoch differierten die maximalen Werte von im Sommer 31,0 ng/l gegenüber der "Wintermilch" (31,7 ng/l) kaum.

Regensburg:

Die Erwartungen bezüglich Vorkommen und Konzentrationen der AFM₁-Gehalte entsprachen denen des Münchner Einzugsgebietes, da Regensburg ebenfalls als Mischgebiet ausgewählt wurde.

Mit 6,1% positiver Proben stellt es das Gebiet mit dem zweitniedrigsten AFM₁-Vorkommen dar.

Beim Vergleich der mittleren Konzentrationen von "Sommer-" und "Wintermilch" ist kaum ein Unterschied (Sommer: 22,4 ng/l; Winter: 24,2 ng/l) festzustellen. Aber auch in dieser Region wurde in der "Sommermilch" eine um 4,6% höhere Anzahl positiver Proben sowie der höchste prozentuale Anteil positiver Proben (Juni und Juli je 14%) gefunden. Jedoch finden sich bei Betrachtung der einzelnen Monate der höchste durchschnittliche AFM₁-Gehalt der positiven Proben (März: 31,3 ng/l) ebenso wie die drei Maximalkonzentrationen über 50 ng/l in der "Wintermilch".

Schweinfurt:

Im Schweinfurter Einzugsgebiet als reinem Ackerbaugebiet wurden sowohl das höchste AFM₁-Vorkommen als auch die höchsten AFM₁-Konzentrationen in der Bestandsmilch erwartet.

Mit einem Anteil von 19,6% positiven Proben lag Schweinfurt auch tatsächlich weit an der Spitze der vier Gebiete. Die Anzahl positiver Proben war im Winter deutlich höher (23,3 %) als im Sommer (14,0%). Die durchschnittliche AFM₁-Konzentration der Proben lag jedoch in "Wintermilch" mit 17,7 ng/l unter der von "Sommermilch" (22,1 ng/l). Die im Monat höchste durchschnittliche

AFM₁-Konzentration fand sich im August (34,2 ng/l), der höchste prozentuale Anteil positiver Proben (31,0%) lag im April. Vier Proben überstiegen mit ihrer Konzentration 50 ng AFM₁/l, wobei jeweils zwei in "Sommer-" und "Wintermilch" gefunden wurden. Mit 68,9 ng/l war der in "Wintermilch" bestimmte Maximalwert (nur) geringfügig höher als der Maximalwert der "Sommermilch" (65,8 ng/l).

Betrachtet man abschließend das Gesamtergebnis aller untersuchten Proben, ergibt sich ein etwas günstigeres Ergebnis bezüglich der "Sommermilch" mit 8,5 % positiven Proben gegenüber 10,5 % in "Wintermilch". Ebenso lagen in der "Sommermilch" die mittlere (19,4 ng/l) und die maximale Konzentration (65,8 ng/l) unter den entsprechenden Werten (x_A : 21,6 ng/l; x_{max} : 68,9 ng/l) der "Wintermilch". Die festgestellten Unterschiede sind in ihrer Ausprägung jedoch zu gering, um von einer deutlichen jahreszeitlichen Schwankung der Gesamtheit der untersuchten Proben sprechen zu können.

Dagegen konnten eindeutige regionale Schwankungen (und innerhalb der einzelnen Gebiete teilweise (Schweinfurt, Kempten) auch jahreszeitliche Schwankungen festgestellt werden.

Zu bemerken ist weiterhin, daß die Region mit überwiegendem Ackerbau bezüglich Vorkommen und Konzentration der AFM₁-Gehalte in Bestandsmilch deutlich schlechter abschneidet als die Gebiete, in denen sowohl Grünland- als auch Ackerbau betrieben wird.

Über die Zeitspanne eines Jahres (1987/88) wurde Bestandsmilch bei Abholung durch die Molkerei entnommen und zur enzymimmunologischen Untersuchung auf Aflatoxin M₁ (AFM₁) an den Lehrstuhl versandt. Die Proben stammten aus vier Gebieten Bayerns mit unterschiedlicher Agrarstruktur aus Einzugsgebieten des Milchprüfrings (Kempten, München, Regensburg und Schweinfurt). Pro Gebiet wurden jeweils 50 Betriebe zufällig ausgewählt. Die Probenentnahme erfolgte in den Monaten Februar, März, April, Mai, Oktober und November einmal wöchentlich, in den Monaten Juni, Juli, August, September, Dezember und Januar 14tägig.

Sämtliche Proben wurden zunächst mit einem semiquantitativen Suchtest (HEUSEL, 1987) geprüft und die so vorselektierten positiven Proben mit einem quantitativen (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1985) Verfahren nachuntersucht. Beide Verfahren waren am Lehrstuhl erarbeitet worden.

Von den insgesamt 6445 untersuchten Proben waren 624 (9,6 %) positiv (>10 ng/l). Davon wiesen 612 (9,5 %) AFM₁-Gehalte zwischen 10-50 ng/l auf, 224 (3,5 %) lagen über 20 ng/l und 12 (0,2 %) über 50 ng/l (Vorgesehener Grenzwert für Säuglings- und Kleinkindernahrung ist 10 ng/l, während einer Übergangszeit 20 ng/l).

Bei der Auswertung nach Gebieten ergab sich folgende Verteilung: Kempten (Weidegebiet): von 1465 untersuchten Proben waren 142 (9,6 %) positiv; Höchstwert 65,2 ng/l.

München (Mischgebiet): von 1533 untersuchten Proben waren 35 (2,3 %) positiv; Höchstwert 31,7 ng/l.

Regensburg (Mischgebiet): von 1697 untersuchten Proben waren 104 (6,1 %) positiv; Höchstwert 68,9 ng/l.

Schweinfurt (Ackerbaugbiet): von 1750 untersuchten Proben waren 343 (19,6 %) positiv; Höchstwert 68,9 ng/l.

Das Untersuchungsergebnis unterstreicht die Notwendigkeit einer gesetzlichen Festlegung von Höchstgehalten für AFM₁ in Milch und Milcherzeugnissen, da trotz Reglementierung der AFB₁-Gehalte in Futtermitteln mit dem Vorkommen von AFM₁ in Bestandsmilch gerechnet werden muß.

Summary

Studies on the application of the enzymimmunoassay for the detection of AFM_1 in milk samples in Bavaria

For a period of one year (1987/88) milk samples taken by the dairy were sent to the institute for enzymimmunological analysis of Aflatoxin M_1 (AFM_1). The samples came from farms of four regions of the milk quality investigating laboratory of Bavaria, each region having a different agriculture structure (Kempten, München, Regensburg, Schweinfurt). Fifty farms were chosen at random in each area. The samples were taken once a week in February, March, April, May, October, and November and once every two weeks in June, July, August, September, December and January. All samples were first analyzed with a semiquantitative test (HEUSEL, 1987). The preselected positive samples finally were analyzed quantitatively with the test described by MÄRTLBAUER and TERPLAN (1985). Of the 6445 analyzed samples, 624 were positive. 612 of the positive samples contained AFM_1 -contents from 10 to 50 ng/l and 12 samples more than 50 ng/l. (The intended maximum concentration for baby- and children food is 10 ng/l; during a transition stage 20 ng/l.)

The examination of the samples of the different areas showed the following results:

Schweinfurt (arable land): of 1750 analyzed samples 343 (19,6%) were positive, maximum value: 68,9 ng/l.

Kempten (pasture): of 1465 analyzed samples 142 (9,6%) positive, maximum value: 65,2 ng/l.

München (mixed area): of 1533 analyzed samples 35 (2,3%) were positive, maximum value: 31,7 ng/l.

Regensburg (mixed area): of 1697 analyzed samples 104 (6,1%) were positive, maximum value: 68,9 ng/l.

The result of the investigation emphasizes the necessity for a legal regulation of the limits for AFM_1 in milk and milk products, as despite the regulation of the AFB_1 -contents in feed the occurrence of AFM_1 in farm milk must be expected.

Ames, B.N., W.E. DURSTON, E. YAMASAKI und F.D. LEE (1973):
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining
liver homogenates for activation and bacteria for detection
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285

APPLEBAUM, R.S. und E.H. MARTH (1983):
Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: concentration of
blood serum constituents and hormones associated with liver-
kidney dysfunction and maintenance in lactation
Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18, 381-386

APPLEBAUM, R.S., R.E. BRACKETT, D.W. WISEMAN, E.H. MARTH,
(1982a):
Aflatoxin: Toxicity to dairy cattle and occurrence in milk and
milkproducts - a review
J. Food Protection 45, 752-777

APPLEBAUM, R.S., R.E. BRACKETT, D.W. WISEMAN und E.H. MARTH
(1982b):
Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: Feed intake and
yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with
pure and impure aflatoxin
J. Dairy Sci. 65, 1503-1508

BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND
FORSTEN (1986):
Bayerischer Agrarbericht

BUNDESGESUNDHEITSAMT (BGA) (1982):
Nachweis und Bestimmung von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpro-
dukten (Schuller Methode)
Amtl. Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG,
Bd. I/1, L 01.00-14
Beuth Verlag, Berlin - Köln

BUNDESMINISTER FÜR JUGEND, FAMILIE UND GESUNDHEIT (1985):
Entwurf: erste Verordnung zur Änderung der Aflatoxin-Verordnung
(unveröffentlicht)

BUSBY, W.F. und G.N. WOGAN (1981)

Aflatoxins

In: SHANK, R.L.: Mycotoxins and N-nitroso compounds:
environmental risks, Vol 2, p. 3-28
CRC Press, Boca Raton

BUSBY, W.F. und G.N. WOGAN (1984): *

Aflatoxins

In: SEARLE, Ch. E.: Chemical carcinogens, p. 945-1093
Am. Chem. Soc. Washington D.C.

BUTLER, W.H. (1964):

Acute toxicity of aflatoxin B₁ in rats
Br. J. Cancer 18, 756-762

Derselbe (1971):

Further ultrastructural observations on injury of rat hepatic
parenchymal cells induced by aflatoxin B₁
Chem.-Biol. Interact. 4, 49-65

Derselbe (1974):

Aflatoxin

In: PURCHASE, J.F.W.: Mycotoxins, p. 1-28
Elsevier Sci. Publ., Amsterdam u.a.

CAMPBELL, T.C. und J.R. HAYES (1976):

The role of aflatoxin metabolism in its toxic lesion
Tox. appl. Pharmacol. 35, 199-222

CANTON, J.H., R. KROES, M.J. VAN LOTGEN, M. VAN SCHOTHORST,
J.F.C. STAVENUTTER und C.A.H. VERHÜLSDONK (1975):
The carcinogenicity of aflatoxin M₁ in rainbow trout
Fd. Cosmet. Toxicol. 13, 441-443

CHANG, Ch.-F. und P.B. HAMILTON (1979):

Impaired phagocytosis by heterophils from chickens during aflatoxicosis

Tox. appl. Pharmacol. 48, 459-466

CIEGLER, A. (1975):

Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity

Lloydia 38, 21-35

COULTER, J.B.S., S.M. LAMPLUGH, G.I. SULIMAN, M.I.A. OMER und R.G. HENDRICKSE (1984):

Aflatoxins in human breast milk

Ann. Trop. Paediatrics 4, 61-66

CROY, R.G. und G.N. WOGAN (1981):

Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B₁

Cancer Res. 41, 197-203

CULLEN, J.M., B.H. RUEBNER, L.S. HSIEH, D.M. HYDE und D.H. HSIEH (1987):

Carcinogenicity of dietary aflatoxin M₁ in male Fischer rats compared to aflatoxin B₁

Cancer Res. 47, 1913-1917

CYSEWSKI, S.J., R.L. WOOD, A.C. PIER und A.L. BAETZ (1978):

Effects of aflatoxin on the development of acquired immunity to swine erysipelas

Am. J. Vet. Res. 39, 445-448

DEGEN, G.H. und H.G. NEUMANN (1978):

The major metabolite of aflatoxin B₁ in rats is a glutathion conjugate

Chem. Biol. Interact. 22, 239-255

ENGEL, G. und H. HAGEMEISTER (1978):

Untersuchungen über den Verbleib von Aflatoxin B₁ im Verdauungstrakt von Kühen

Milchwissenschaft 33, 21-23

ESSIGMANN, J.M., R.G. CROY, A.M. NADZAN, W.F. BUSBY, V.N.

REINHOLD, G. BUCHI und G.N. WOGAN (1977):

Structural identification of the major DNA adduct formed by Aflatoxin B₁ in vitro

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 74, 1870-1874

FUTTERMITTELVERORDNUNG vom 23.1.1985:

BGBI I S. 170-176

GARNER, R.C. und C.N. MARTIN (1979):

Fungal toxins, aflatoxins and nucleic acids

In: GROVER, P.L.: Chemical carcinogens and DNA, p. 187-226

CRC Press, Boca Raton

GIAMBRONE, J.J., D.I. EWERT, R.D. WYATT und C.S. EDISON (1978):

Effect of aflatoxin on the humoral and cellmediated immune systems of the chicken

Am. J. Vet. Res. 39, 305-308

GURTOO, H.L. (1973):

Binding of aflatoxin B₁ and its metabolites to hepatic microsomes

Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 649-655

GURTOO, H.L. und T.C. CAMPBELL (1974):

Metabolism of aflatoxin B₁ and its metabolism-dependent and independent binding to rat hepatic microsomes

Molec. Pharmacol. 10, 776-789

GURTOO, H.L. und L. MOTYCKA (1976):

Effect of sex difference on the in-vitro and in-vivo metabolism of Aflatoxin B₁ in the rat

Cancer Res. 36, 4663-4671

HALVORSON, M.R., T.D. PHILLIPS, S.H. SAFE und L.W. ROBERTSON (1985):

Metabolism of aflatoxin B₁ by rat hepatic microsomes induced by polyhalogenated biphenyl congeners
Appl. Environ. Microbiol. 49, 882-886

HAMILTON, P.B. (1984):

Determining safe levels of mycotoxins
J. Food Protection, 47, 570-575

HAMILTON, P.B. und HARRIS J.R. (1971):

Interaction of aflatoxicoses with Candida albicans infections and other stresses in chickens
Poult. Sci., 50, 906-912

HEESCHEN, W., A. BLÖTHGEN und H. NIJHUIS (1986):

Entwicklungstendenzen in der rückstandshygienischen Situation der Milch
Kieler milchwirtsch. Forschungsber. 38, 131-145

HEESCHEN, W., H. NIJHUIS und A. BLÖTHGEN (1983):

Aflatoxin M₁ -Bildung, Analytik, Carry over aus Futtermitteln und Situation in der Milch
Dtsch. Molkereizeitung 104, 1434-1440

HEESCHEN, W., A. BLÖTHGEN, A. TOLLE und G. ENGEL (1981)

Untersuchungen zum Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver in der Bundesrepublik Deutschland
Milchwissenschaft 36, 1-4

HEUSEL, A. (1987):

Untersuchungen zur Vereinfachung des enzymimmunologischen Nachweises von Aflatoxin M₁ in Milch
Diss. med. vet., München

HOLZAPFEL, C.W. und P.S. STEYN (1966):

Isolation and structure of aflatoxins M_1 and M_2

Tetrahedron Letters 25, 2799-2803

HSIEH, D.P.H., Z.A. WONG, J.J. MICHAS, C. und B.H. RUEBNER

(1977):

Comparative metabolism of aflatoxins

In: RODRICKS, J.V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN: Mycotoxins
in human and animal health, p. 37-50

Pathotox Publ., Park Forest South, Illinois

ISRAEL-KALINSKY, H., J. TUCH, J. ROITELMAN und A.A. STARK (1982):

Photoactivated aflatoxins are mutagens to Salmonella typhimurium
and bind covalently to DNA in vitro

Carcinogenesis 3, 423-429

KANEKO, J.J. und C.E. CORNELIUS (1971):

Clinical biochemistry of domestic animals, Vol. II

Academic Press, New York u.a.

KIERMEIER, F. (1977):

The significance of aflatoxins in the dairy industrie

IDF, Ann. Bull. Doc. 98, 2-23

DERSELBE (1978):

Einführung in die Mykotoxin-Problematik

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 167, 115-127

DERSELBE (1981):

Mykotoxine in Milch und Milchprodukten

In: REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 245-271

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

DERSELBE (1985):

Das Mykotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittelüberwachung

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 389-393

KIERMEIER, F., V. REINHARDT und G. BEHRINGER (1975):

Zum Vorkommen von Aflatoxinen in Rohmilch

Dtsch. Lebensm.- Rdsch. 71, 35-38

KIERMEIER, F., G. WEISS, G. BEHRINGER, M. MILLER und K. RANFFT
(1977):

Vorkommen und Gehalt an Aflatoxin M₁ in Molkerei-Anlieferungs-
milch

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163, 171-174

LEWIS, G., L.M. MARKSON und R. ALLCROFT (1967):

The effect of feeding toxic groundnut meal to sheep over a period
of five years

Vet. Rec. 80, 312-314

LOOSMORE, R.M. und L.M. MARKSON (1961):

Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal

Vet. Rec. 73, 813-814

LYNCH, G.P., W.T. SHALKOP, N.M. JAROBY, D.F. SMITH und R.W.
MILLER (1971):

Responses of dairy cows to oral doses of aflatoxin

J. Dairy Sci. 54, 1688-1698

LYNCH, G.P., D.F. SMITH, F.C. COVEY und C.H. GORDON (1973):

Aflatoxin and nitrogen balance in the young calf

J. Dairy Sci. 56, 1154-1158

MÄRTLBAUER, E. (1985):

Zur Systematik und praktischen Anwendung enzymimmunologischer
Nachweise von Mykotoxinen

Mykotoxin Workshop "Berichterstattung und interner Erfahrungsaus-
tausch über Trichothecene und andere toxische Metabolite von
Pilzen" am 19./20. März in München

(unveröffentlicht)

MARTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1985):

Ein hochempfindlicher heterologer enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin M₁ in Milch und Milchpulver
Arch. Lebensmittelhyg. 36, 53-55

MARTIN, C.N. und R.C. GARNER (1977):

Aflatoxin B₁-oxide generated by chemical or enzymatic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids
Nature 267, 863-865

MAJERUS, P. und R. WOLLER (1985):

Aflatoxin M₁ in Milch und Milcherzeugnissen. Methodik und Bestandsaufnahme
Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 39, 39

MERTENS, D.R. (1979):

Biological effects of mycotoxins upon rumen function and lactating dairy cows
In: Interaction of mycotoxins in animal production: Proceedings of a symposium, p. 118-136
Natl. Acad. Sci. U.S.

MONEY-KYRLE, A.F. (1977):

Do aflatoxin and polycyclic hydrocarbon carcinogens delete genes in the regions of chromosomes acted on by steroid hormones
Med. Hypotheses 3, 146-149

MOREAU, C. (1979):

Moulds, toxins and food
WILEY, Chichester u.a.

MÖCKE, W. und H. SCHULZE (1981):

Höchstmengenregelungen für Mykotoxine
In: REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 489-509
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

NEAL, G.E., D.J. Judah, F. STIRPE und D.S.P. PATTERSON (1981):
The formation of 2,3-Dihydroxy-2,3dihydro aflatoxin B₁ by the
metabolism of AFB₁ by liver microsomes isolated from certain
avian and mammalian species and the possible role of this meta-
bolite in the acute toxicity of AFB₁
Toxicol. Appl. Pharmacol. 58, 431-437

NEWBERNE, P.M. und W.H. BUTLER (1969):
Acute and chronic effects of aflatoxin in the liver of domestic
and laboratory animals
Cancer Res. 29, 236-250

OBIOHA, W.I., H.M. STAHR und A.A. KRAFT (1986):
Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after
feeding radiolabeled (¹⁴C) aflatoxin B₁
J. Food Prot. 49, 799-805

PATTERSON, D.S.P. (1973):
Metabolism as a factor in determining the toxic action of the
aflatoxins in different animal species
Fd. Cosmet. Toxicol. 11, 287-294

PATTERSON, D.S.P. und B.A. ROBERTS (1970):
The formation of aflatoxins B_{2a} and G_{2a} and their degradation
products during the in vitro detoxification of aflatoxins by
livers of certain avian and mammalian species
Fd. Cosmet. Toxicol. 8, 527-538

PATTERSON, D.S.P., B. J. SHREEVE und B.A. ROBERTS (1980):
Mycotoxin residues in body fluids and tissues of food-producing
animals
Zbl. Bakt. Suppl. 8: Medical Mycology, p. 321-328

PESTKA, J.J., Y. LI, W.O. HARDER und F.S. CHU (1981):
Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent
assay for determining aflatoxin M₁ in milk
JAOAC 64, 294-301

PIER, A.C. und K.L. HEDDLESTON (1970):

The effect of aflatoxin on immunity in turkeys. I. Impairment of actively acquired resistance to bacterial challenge
Avian Dis. 14, 797-809

PIER, A. C., R.E. FICHTNER und S.J. CYSEWSKI (1977):

Effects of aflatoxin on the cellular immune system
Ann. Nuer. Alim. 31, 781-788

PIER, A.C., J.L. RICHARD und J.R. THURSTON (1980):

Effects of aflatoxin on the mechanisms of immunity and native resistance

Zbl. Bakt. Suppl.8: Medical Mycology, p. 301-309

PIVA, G., A. PIETRI und E. Carini (1985):

Presenza di aflatoxina M_1 in prodotti lattiero-caseari, 1 nota: latti e formaggi prodotti in Italia

Riv. Soc. Ital. Sci. Alim. 14, 59-62

zit. n. PIVA, G., A. PIETRI, L.GALAZZI und O.CURTO (1987):

Aflatoxin M_1 occurence in dairy products marketed in Italy
Fd. Addit. Contam. 5, 133-139

PIVA G., A. PIETRI, L. GALAZZI und O. Curto (1987):

Aflatoxin M_1 occurence in dairy products marketed in Italy
Fd. Addit. Contam. 5, 133-139

POLZHOFER, K. (1977):

Aflatoxinbestimmung in Milch und Milchprodukten

Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 163, 175-177

PRICE, R.L., J.H. PAULSON, O.G. LOUGH, C. GINGG und A.G. KURTZ (1985):

Aflatoxin conversion by dairy cattle consuming naturally- contaminated whole cottonseed

J. Food Prot. 48, 11-15

RAJ, H.J., M.S. CLEARFIELD und P.D. LOTILKAR (1984):

Comparative kinetic studies on AFB₁-DNA binding and AFB₁ glutathione conjugation with rat and hamster livers in vitro
Carcinogenesis 5, 879-884

RANFFT, K. (1983):

Aflatoxin M₁ in Milchpulver - Ein schnelles Bestimmungsverfahren und eine Bestandsaufnahme zum Vorkommen
Milchwissenschaft 38, 328-329

RIBERZANI, A., S. Castelli, A. DEL VO' und C. PEDRETTI (1983):

Aflatossina M₁ in alcuni alimenti base di latte
Ind. Alim. 22, 342-342

zit. n. PIVA, G., A. PIETRI, L. GALAZZI und O. CURTO (1987):

Aflatoxin M₁ occurrence in dairy products marketed in Italy
Fd Addit. Contamin. 5, 133-139

RICHARD, J.L. and J.R. THURSTON (1975):

Effect of aflatoxin on phagocytosis of Aspergillus fumigatus spores by rabbit alveolar macrophages
Appl. Microbiol. 30, 44-47

SHABORT, J.C. und M. STEYN (1969):

Substrate and phenobarbital inducible aflatoxin-4-hydroxylation and aflatoxin metabolism by rat liver microsomes
Biochem. Pharmacol. 18, 2241-2252

SCHULTZ, G. (1980):

Kontamination der Milch mit Mykotoxinen
Dtsch. tierärztl. Wschr. 87, 232-233

SIEBER, R. und B. BLANC (1978):

Zur Ausscheidung von Aflatoxin M₁ in die Milch und dessen Vorkommen in Milch und Milchprodukten - eine Literaturübersicht
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 69, 477-491

STARK, A.A. (1986):

Molecular aspects of aflatoxin B₁ mutagenesis and carcinogenesis

In: STEYN, P.S. und R. VLEGGAR: Mycotoxins and Phycotoxins,
p. 435-445

Elsevier Sci. Publ., Amsterdam

STARK, A.A. und C.N. GIROUX (1983):

Mutagenesis of Pneumococcus by transformation with DNA modified
by the carcinogen-mutagen AFB₁

Mut. Res. 107, 23-32

STOLOFF, L. (1980):

Aflatoxin M in perspective

J. Food Prot. 43, 226-230

THURSTON, J.R., J.L. RICHARD, S.J. CYSEWSKI, A.C. PIER und
C.K. GRAHAM (1972):

Effect of aflatoxin on complement activity in guinea pigs
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 300-303

TRUCKSESS, M.W. und S.W. PAGE (1986):

Examination of imported cheeses for Aflatoxin M₁

J. Food Prot. 49, 632-633

VAN MILCZEWSKI, K.E., G. ENGEL und M. TEUBER (1981):

Bekannte Mykotoxine und ihre Merkmale

In: REISS, J.: Mykotoxine in Lebensmitteln, p. 14-84

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - New York

VERORDNUNG ÜBER HÖCHSTMENGEN AN AFLATOXINEN IN LEBENSMITTELN
(AFLATOXIN-VERORDNUNG) vom 30.11.1976:

BGBI I S. 3313

WONG, J.J., und D.S.P. HSIEH (1976)

Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and
carcinogenic potential

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 2241-2244

WONG, J.J., R. SINGH und D.P.H. HSIEH (1977):

Mutagenicity of fungal metabolites related to aflatoxin biosynthesis

Mut. Res. 44, 447-450

WOGAN, G.N. (1977):

Mode of action of aflatoxins

In: RODRICKS, J. V., C.W. HESSELTINE und M.A. MEHLMAN (1977):

Mycotoxins in human and animal health, p.29-36

Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois

WOGAN, G.N. und S. PAGLIALUNGA (1973):

Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats

Fd. Cosmet. Toxicol. 12, 381-384

WOGAN, G.N., J.M. ESSIGMANN, R.G. CROY, W.F. BUSBY,

J.D. GROOPMAN und A.A. STARK (1979):

Macromolecular binding of AFB₁ and sterigmatocystin: relationships of adduct pattern to carcinogenesis and mutagenesis

In: MILLER, E.C., J.A. HIRONO, J. SUGIMARA, T. und S. TAKAYAMA:

Naturally occurring carcinogens, mutagens and modulators of carcinogenesis, p. 19-33

Univ. Park Press, Baltimore

WYATT, R.D., M.D. RUFF und R.K. PAGE (1975):

Interaction of aflatoxin with Eimeria tenella infection and monensin in young broiler chickens

Avian Dis. 19, 730-740

ZIMMERLI, B. und O. BLASER (1979):

Vorkommen von Aflatoxin M₁ in Milch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 70, 287-293

Bei Herrn Professor Dr. Dr. h.c. G. Terplan möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und seine stets freundliche Anleitung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Erwin Märtlbauer für die ausgezeichnete Betreuung sowie seine jederzeit selbstverständlich gewährte Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Margit Straka, Herrn Richard Dietrich und allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit und dem guten Arbeitsklima beigetragen haben, recht herzlich bedanken.

Herrn Dr. v. Hund möchte ich für die Genehmigung der Probenbeschaffung über den Milchprüfring danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Fischer vom MPR Regensburg, Herrn Franz vom MPR Schweinfurt, Herrn Göschl vom MPR München, Herrn Hegele vom MPR Kempten und ihren Mitarbeitern für die Beschaffung und Versendung der Proben sowie Frau Hohenadel als "Probenzentrale".

Ein persönliches Anliegen ist es mir, meinen Brüdern Wolfgang und Frank, meiner Freundin Tessie und meiner Freundin Iris, sowie Andrew für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit zu danken.

Lebenslauf

Am 19.9.1960 wurde ich, Ursula Bachner, als drittes Kind des Reg.-landw.-Direktors Dr. Wolfgang Bachner und seiner Ehefrau Annemarie geb. Horn, in Bad Waldsee geboren.

Von 1967-1969 besuchte ich die Grundschule Laupheim. Durch Umzug nach Bad Waldsee wechselte ich in die dortige Grundschule bis Sommer 1971. Im Herbst 1971 trat ich in das Gymnasium Bad Waldsee ein, an dem ich im Juni 1980 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1980/81 begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Veterinärmedizin. Nach Abschluß des ersten Fachsemesters im Frühjahr 1981 setzte ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und bestand dort im März 1987 das Tierärztliche Staatsexamen. Im April 1987 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

Von April 1987 bis Dezember 1988 war ich als Doktorand am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München tätig.

